

**Herstellung, Charakterisierung und in vivo Funktionsanalyse von
Intrabodies gegen die Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialV**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Stefan Somplatzki
aus Überlingen

1. Referent: Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referentin: Professorin Dr. Rita Gerardy-Schahn
eingereicht am: 03.06.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am: 23.10.2013

Druckjahr 2013

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle..... | 1 |
| 1.1.1 Zelladhäsion..... | 1 |
| 1.1.2 Zelladhäsionsmoleküle | 1 |
| 1.1.3 Neutrales Zelladhäsionsmolekül | 3 |
| 1.2 Polysialylierung des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls | 6 |
| 1.2.1 Polysialinsäure | 6 |
| 1.2.2 Polysialyltransferasen | 8 |
| 1.2.3 Vorkommen von polysialyliertem NCAM | 11 |
| 1.2.4 Funktion des polysialylierten NCAM..... | 12 |
| 1.2.5 Krebs und Metastasierung..... | 14 |
| 1.3 Antikörper und Intrabodies..... | 17 |
| 1.3.1 Antikörper | 17 |
| 1.3.2 Intrabodies..... | 19 |
| 1.3.3 Anwendung von Intrabodies | 21 |
| 1.4 Zielsetzung..... | 24 |
| 2. Material und Methoden..... | 26 |
| 2.1 Materialien | 26 |
| 2.1.1 Antikörper | 26 |
| 2.1.2 Enzyme und Proteine | 26 |
| 2.1.3 Geräte | 27 |
| 2.1.4 Kits..... | 27 |
| 2.1.5 Lösungen, Puffer und Medien..... | 28 |
| 2.1.6 Molekulargewichtsmarker | 29 |
| 2.1.7 Oligonukleotide..... | 29 |
| 2.1.8 Plasmide und Vektoren | 30 |
| 2.1.9 Programme..... | 30 |
| 2.1.10 Reagenzien | 31 |
| 2.1.11 Zelllinien | 31 |
| 2.2 Molekularbiologische Methoden | 32 |
| 2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hybridomazellen | 32 |
| 2.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA/DNA | 33 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.2.3 | RNA/DNA Agarose-Gelelektrophorese | 33 |
| 2.2.4 | cDNA-Synthese | 33 |
| 2.2.5 | Generierung doppelsträngiger cDNA mit glatten Enden..... | 33 |
| 2.2.6 | Aufreinigung von DNA | 34 |
| 2.2.7 | Ligation einer Adaptersequenz an doppelsträngige cDNA | 34 |
| 2.2.8 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 34 |
| 2.2.9 | Elution von DNA aus Agarose-Gelen..... | 35 |
| 2.2.10 | TA-Klonierung..... | 35 |
| 2.2.11 | Transformation per Elektroporation..... | 35 |
| 2.2.12 | Blau-Weiß-Selektion..... | 36 |
| 2.2.13 | Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion..... | 36 |
| 2.2.14 | Plasmid-Präparation | 36 |
| 2.2.15 | DNA-Sequenzierung | 37 |
| 2.2.16 | <i>Assembly</i> -Polymerase-Kettenreaktion..... | 37 |
| 2.2.17 | Restriktionsverdau mit Endonukleasen..... | 37 |
| 2.2.18 | Ligation | 38 |
| 2.2.19 | Ortsspezifische Mutagenese..... | 38 |
| 2.3 | Zellbiologische Methoden | 39 |
| 2.3.1 | Auftauen und Einfrieren von Zellen | 39 |
| 2.3.2 | Zellkultur..... | 39 |
| 2.3.3 | Bestimmung der Zellzahl..... | 40 |
| 2.3.4 | Transfektion von Plasmid-DNA | 40 |
| 2.3.5 | Fixierung und Permeabilisierung von Zellen..... | 41 |
| 2.3.6 | Zelllyse..... | 41 |
| 2.3.7 | Bestimmung der Antibiotika-Toxizität | 41 |
| 2.3.8 | Generierung stabiler Zelllinien | 42 |
| 2.3.9 | Proliferationsassay | 42 |
| 2.4 | Proteinchemische und immunologische Methoden | 43 |
| 2.4.1 | Immunfluoreszenz..... | 43 |
| 2.4.2 | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) | 43 |
| 2.4.3 | Immunpräzipitation..... | 44 |
| 2.4.4 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 45 |
| 2.4.5 | Immunblot..... | 45 |
| 2.4.6 | Durchflusszytometrie | 46 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.4.7 | Messung der Luziferaseaktivität | 47 |
| 2.5 | <i>In vivo</i> Experimente | 47 |
| 2.5.1 | Maushaltung..... | 47 |
| 2.5.2 | Zellinjektion..... | 48 |
| 2.5.3 | <i>In vivo imaging system</i> (IVIS) | 48 |
| 3. | Ergebnisse..... | 49 |
| 3.1 | Herstellung von Intrabodies gegen die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV | 49 |
| 3.1.1 | RNA-Isolierung aus anti-ST8SiaII- und anti-ST8SiaIV- produzierenden Hybridomazellen und Generierung doppelsträngiger cDNA mit einer Adaptersequenz | 50 |
| 3.1.2 | Amplifikation der DNA der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten der Antikörper anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV sowie einer <i>linker</i> -Sequenz | 51 |
| 3.1.3 | Synthese der anti-ST8SiaII- und anti-ST8SiaIV-scFv-DNA- Fragmente und Klonierung in den Expressionsvektor pCMV/ <i>myc</i> /ER..... | 54 |
| 3.1.4 | Expression der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV..... | 56 |
| 3.2 | Charakterisierung der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV..... | 57 |
| 3.2.1 | Nachweis der Bindung zwischen den Intrabodies und den Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV sowie der ER- Retention | 57 |
| 3.2.2 | Nachweis der reduzierten Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM durch Expression der Intrabodies anti- ST8SiaII und anti-ST8SiaIV | 64 |
| 3.3 | <i>In vivo</i> Funktionsanalyse der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV .. | 68 |
| 3.3.1 | Generierung von stabilen Intrabody-exprimierenden TE671- Rhabdomyosarkom-Zelllinien | 68 |
| 3.3.2 | Injektion der stabilen Intrabody-exprimierenden TE671-Zelllinien in immundefiziente Mäuse zur Visualisierung des Tumorwachstums und der Metastasierung | 75 |
| 4. | Diskussion | 79 |
| 4.1 | Herstellung von Intrabodies aus der RNA von Hybridomazellen | 79 |
| 4.2 | Charakterisierung der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV..... | 80 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2.1 | Bindungsanalyse | 80 |
| 4.2.2 | Funktionsanalyse..... | 82 |
| 4.3 | <i>In vivo</i> Funktionsanalyse der Intrabodies gegen die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV | 86 |
| 4.4 | Ausblick..... | 88 |
| 5. | Zusammenfassung | 90 |
| 6. | Anhang..... | 91 |
| 6.1 | Klonierungsvektoren..... | 91 |
| 6.2 | Sequenzen der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies..... | 93 |
| 6.3 | Abkürzungsverzeichnis..... | 95 |
| 6.4 | Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 100 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 103 |

1. Einleitung

1.1 Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle

1.1.1 Zelladhäsion

Die Grundlage für die Existenz mehrzelliger Organismen ist die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität und Ordnung von Geweben und Organen. Die Voraussetzung dafür ist die funktionierende Interaktion der einzelnen Zellen untereinander (Zell-Zell-Adhäsion) sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Adhäsion). Diese in ihrer Gesamtheit als Zelladhäsion bezeichnete Funktion wird über Zelladhäsionsmoleküle vermittelt, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Neben der grundsätzlichen Funktion der Strukturgebung werden durch die Zelladhäsion auch Prozesse wie die Zellproliferation, ihre Differenzierung und die Migration sowie Aggregation von Zellen gesteuert.

Die Ausbildung und Lösung von Zellkontakten untereinander führt zu Segregation und Dispersion von Zellen (Ein- und Austritt in einen oder aus einem Zellverband) und ist ein wesentlicher Bestandteil der Histogenese. Zell-Matrix-Kontakte entscheiden hingegen über die Migration von Zellen. In der Embryonalentwicklung ist die Zellmigration von essentieller Bedeutung, um beim Aufbau des Organismus die sich differenzierenden Zellen an ihre Bestimmungsorte zu bringen. In adulten Organismen ist die Zellmigration dann auf konkrete physiologische Mechanismen wie die Funktionalität des Immunsystems oder der Prozess der Wundheilung begrenzt. Störungen der Zelladhäsion gehen einher mit pathologischen Vorgängen, wie zum Beispiel Tumorgenese und Metastasierung. Zugrunde liegt all diesen Prozessen die Ausbildung und Lösung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, welche durch die räumlich und/oder zeitlich differenzierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen gesteuert werden (Ruoslahti und Öbrink, 1996).

1.1.2 Zelladhäsionsmoleküle

Bei Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecule*, CAM) handelt es sich im Allgemeinen um Glykoproteine, die als Transmembranproteine in der Zellmembran

vorliegen, wobei aber auch Proteine ohne intrazelluläre Domäne vorkommen, die dann per Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker in der Zellmembran befestigt sind. Viele Zelladhäsionsmoleküle sind als Adhäsionsrezeptoren in der Lage, Signale von außerhalb der Zelle aufzunehmen und weiterzuleiten, womit Prozesse wie die Genexpression und der Zellzyklus beeinflusst und gesteuert werden können (Aplin *et al.*, 1998).

Es gibt vier Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen, die anhand ihrer Struktur unterschieden werden können: Cadherine, Integrine, Selektine und die Immunglobulin-Superfamilie.

Die meisten Cadherine sind Kalziumionen-abhängige (*calcium-dependent adhesion*) Transmembranproteine vom Typ-I, das heißt, sie besitzen einen zytoplasmatischen C-Terminus und einen extrazellulären N-Terminus. Cadherine sind Teil der Zell-Zell-Adhäsion und vermitteln homophile Bindungen, wobei zwei gleichartige Moleküle miteinander interagieren. Sie sind an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel Signaltransduktion, Stabilisierung von Zellkontakten und Erhaltung der Zellpolarität. Die Cadherine sind nach ihrer Expression in verschiedenen Geweben weiter unterteilt in E-Cadherine (epithelial), N-Cadherine (neuronal und neuro-endokrin), P-Cadherine (plazental) und R-Cadherine (retinal) (Takeichi, 1995). Cadherine vom Typ II, das heißt mit zytoplasmatischem N-Terminus und extrazellulärem C-Terminus, sind die VE-Cadherine (vaskulär-endothelial). Daneben gibt es noch weitere und seltenere Klassen, wie zum Beispiel desmosomale Cadherine, Protocadherine und Cadherin-ähnliche Signalproteine.

Integrine sind Transmembranproteine, die als Heterodimere in der Zellmembran vorkommen und sowohl in der Zell-Zell- als auch in der Zell-Matrix-Adhäsion eine Rolle spielen. Sie werden in nahezu allen Zellen exprimiert mit Ausnahme von roten Blutkörperchen und sind an vielen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel innerhalb des Immunsystems bei der Migration weißer Blutkörperchen (Leukozyten) oder auch in der Blutgerinnung. Die Diversität ihrer Erscheinungsform ergibt sich durch die Kombination verschiedener α - und β -Untereinheiten. Im Menschen ergeben 18 bis 19 α - und 8 β -Untereinheiten bis zu 24 (Hynes, 2002) oder sogar 25 (Humphries, 2000) verschiedene Integrine.

Selektine sind wie die Cadherine Kalziumionen-abhängige Transmembranproteine, die aber heterophile Bindungen eingehen, das heißt zu anderen Molekülen als sich selbst. Auch sie vermitteln dadurch Zell-Zell-Adhäsion und werden je nach Expressionsort unterteilt in E-Selektin (endothelial), L-Selektin (Leukozyten) und P-Selektin (Plättchen). Sie spielen unter anderem eine Rolle im Immunsystem, indem sie Leukozyten abbremsen, wodurch ihr Austritt aus den Blutgefäßen und die Migration zum Entzündungsherd eingeleitet wird.

Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) ist eine große Gruppe von Zelloberflächen- und löslichen Proteinen, die sich durch eine variable Anzahl von sich wiederholenden Ig-ähnlichen Domänen auszeichnen. Dadurch ergeben sich je nach Charakteristik der Domänen (Sequenz und Größe) unterschiedliche Bindungsmöglichkeiten. Zur IgSF gehören beispielsweise Antikörper, Antigen-präsentierende Rezeptoren, T-Zell-Rezeptoren und eine Vielzahl weiterer Rezeptoren. Ihre Funktion ist dementsprechend weit gestreut, von Bindung und Erkennung bis hin zur Zelladhäsion. Das erste in dieser Gruppe isolierte und genauer untersuchte Zelladhäsionsmolekül war das Neurale Zelladhäsionsmolekül (Rutishauser *et al.*, 1976; Brackenbury *et al.*, 1977; Cunningham *et al.*, 1987; Hoffman *et al.*, 1982).

1.1.3 Neurales Zelladhäsionsmolekül

Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (*neural cell adhesion molecule*, NCAM) ist ein Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie (Rutishauser *et al.*, 1976) und besteht in seinem extrazellulären Teil aus fünf Ig-ähnlichen Domänen und zwei Fibronektin-Typ-(III)-Domänen (Hoffman *et al.*, 1982; Cunningham *et al.*, 1987). Strukturell ähnlich zu den Ig-ähnlichen Domänen, können Fibronektin-Typ-(III)-Domänen auch die Zell-Matrix-Adhäsion vermitteln, da sie zuerst im Matrixprotein Fibronektin nachgewiesen und danach benannt wurden (Kornblihtt *et al.*, 1985) (Abb. 1.1 A).

Das NCAM kann in einer Vielzahl von verschiedenen Isoformen auftreten, die durch unterschiedliches Spleißen und Polyadenylierungen eines einzelnen Primärtranskripts gebildet werden (Barthels *et al.*, 1992). Drei Hauptformen werden dabei nach ihrer molekularen Masse unterschieden und als NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180

bezeichnet (Owens *et al.*, 1987). Während NCAM-140 und NCAM-180 Transmembranproteine sind, wird NCAM-120 über einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert. Der Unterschied zwischen NCAM-180 und NCAM-140 betrifft den intrazellulären Teil des Moleküls (Cunningham *et al.*, 1987). Darüber hinaus gibt es auch lösliche Formen des NCAM, bei denen entweder der extrazelluläre Teil vom Rest getrennt werden kann (He *et al.*, 1987; Hubschmann *et al.*, 2005; Kalus *et al.*, 2006) oder bereits das Spleißen zu einer Isoform ohne Membranverankerung geführt hat (Bock *et al.*, 1987; Gower und Walsh, 1989) (Abb. 1.1 B). Weitere Isoformen werden gewebe- und zellspezifisch durch alternatives Spleißen des extrazellulären Teils gebildet (Santoni *et al.*, 1989; Small *et al.*, 1988).

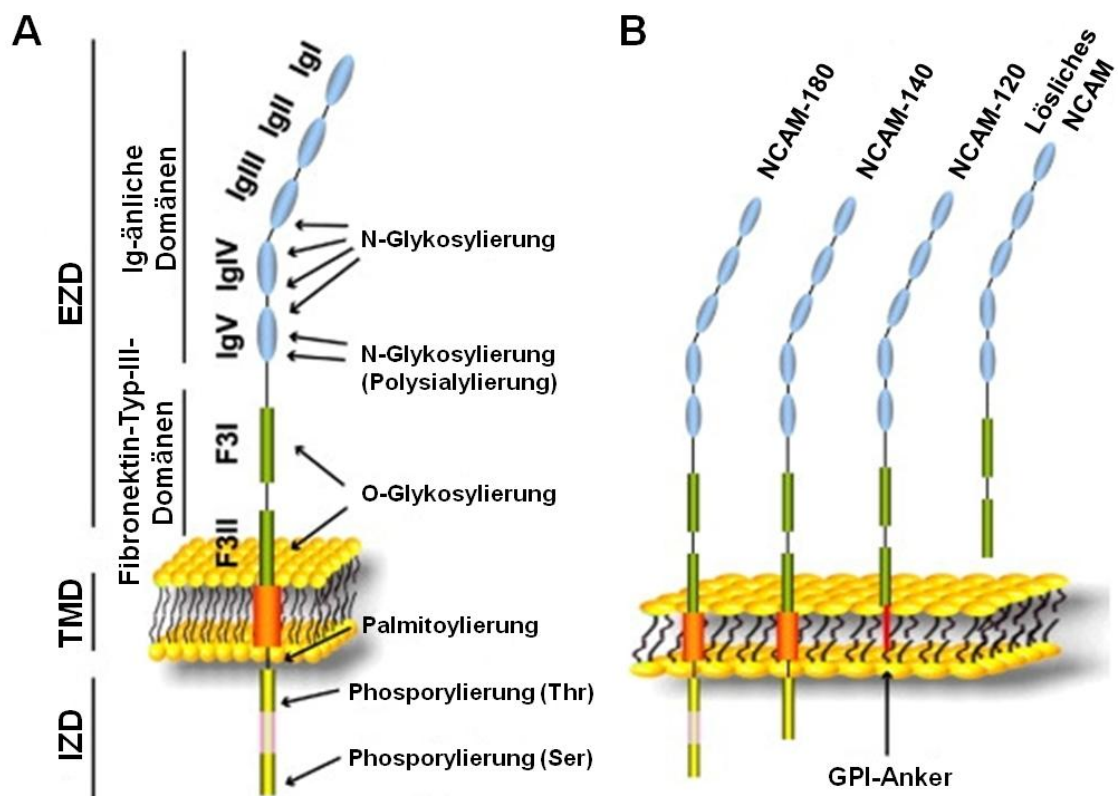


Abbildung 1.1: Struktur des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) sowie dessen dominante Isoformen. A) Die intrazelluläre Domäne (IZD) des NCAM beinhaltet zwei Phosphorylierungsstellen (Serin, Threonin) und eine Palmitoylierungsstelle. Nach der Transmembrandomäne (TMD) folgen in der extrazellulären Domäne (EZD) zwei Fibronectin-Typ-III-Domänen mit zwei O-Glykosylierungsstellen. In den endständigen fünf Ig-ähnlichen Domänen befinden sich sechs N-Glykosylierungsstellen, wovon natürlicherweise nur zwei in der fünften Ig-ähnlichen Domäne polysialyliert werden. B) NCAM-140 besitzt im Gegensatz zu NCAM-180 eine verkürzte IZD, während NCAM-120 nur noch über einen GPI-Anker in der Zellmembran befestigt ist. Lösliches NCAM besteht ausschließlich aus der EZD. (modifiziert nach Gascon *et al.*, 2007)

Der extrazelluläre Teil des NCAM ist durch seine Struktur in der Lage, sowohl hetero- (Friedlander *et al.*, 1994; Burg *et al.*, 1995) als auch homophile (Hoffman *et al.*, 1984) Bindungen einzugehen und kann dabei einerseits *trans*- (mit Molekülen anderer Zellen) als auch *cis*-Bindungen eingehen (mit Molekülen derselben Zelle). Dies beeinflusst nicht nur die Zelladhäsion, sondern führt auch zur Veränderung von Signalkaskaden (Schuch *et al.*, 1989). Als heterophile *trans*-Bindungspartner fungieren unter anderem die Matrixbestandteile Heparin (Cole *et al.*, 1986a; Cole *et al.*, 1986b; Cole und Glaser, 1986) sowie verschiedene Kollagene (Probstmeier *et al.*, 1989; Storms *et al.*, 1996a), außerdem das Heparansulfatproteoglykan Agrin (Storms *et al.*, 1996b) sowie die Chondroitinsulfatproteoglykane Neurocan (Storms und Rutishauser, 1998) und Phosphacan (Grumet *et al.*, 1993). Als *cis*-Bindungspartner wurde das Zelladhäsionsmolekül L1 identifiziert, wodurch die homophile Bindung des L1 verstärkt wird (Kadmon *et al.*, 1990a; Kadmon *et al.*, 1990b), sowie der Fibroblasten Wachstumsfaktorrezeptor (FGFR; *fibroblast growth factor receptor*; Kiselyov *et al.*, 2003), welcher an der Signalkaskade des Neuritenwachstums beteiligt ist. Weitere Bindungspartner des NCAM sind das Prionprotein (Schmitt-Ulms *et al.*, 2001) und ein weiteres Zelladhäsionsmolekül, TAG-1 (Transientes axonales Glykoprotein 1; Milev *et al.*, 1996). Das NCAM stellt außerdem einen Rezeptor für Liganden der GDNF-(*glial cell-derived neurotrophic factor*)-Familie (GFL; *GDNF family of ligands*) dar (Paratcha *et al.*, 2003). Somit ist das NCAM beteiligt an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten und beeinflusst damit die Proliferation, die Zellmigration, das Neuritenwachstum, die Axonbündelung und die Ausbildung von synaptischen Kontakten (Cremer *et al.*, 1997; Doherty *et al.*, 1990; Doherty und Walsh, 1992; Fields und Itoh, 1996; Jorgensen, 1995; Schachner, 1991; Sporns *et al.*, 1995).

Das NCAM wird, wie die Bezeichnung es bereits ausdrückt, hauptsächlich auf Zellen des Nervensystems exprimiert. Daneben kommt es aber auch in der Lunge, Teilen des Verdauungstrakts, dem Herzen (Burroughs *et al.*, 1991), der Skelettmuskulatur (Fidzianska und Kaminska, 1995), der Niere (Filiz *et al.*, 2002), der Leber und in der Bauchspeicheldrüse vor (Kolkova, 2010). Auch auf einem Vertreter der humanen Leukozyten, den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), kann NCAM-140 nachgewiesen werden (Lanier *et al.*, 1991) und wird hier als CD56 (*cluster of differentiation*) bezeichnet. Anhand dieses Markers werden NK-Zellen auch in zwei Gruppen unterteilt (Carson und Caligiuri, 1996; Farag und Caligiuri, 2006). Die Expression der

verschiedenen Isoformen ist zeitlich und zelltypspezifisch reguliert. So kommt NCAM-120 vorwiegend in Gliazellen (Keilhauer *et al.*, 1985) und sensorischen Neuronen der Spinalganglien vor (Rosen *et al.*, 1992), während NCAM-140 und NCAM-180 hauptsächlich in neuronalen Zellen auftreten (Keilhauer *et al.*, 1985). Dabei ist NCAM-140 vorwiegend in prä- und postsynaptischen Membranen zu finden, NCAM-180 hingegen in postsynaptischen Dichten (PSD) reifer Neurone (Persohn *et al.*, 1989; Pollerberg *et al.*, 1985). Mit dem Altern des Organismus lässt die Expression von NCAM-140 und NCAM-180 nach, was zu erhöhter Expression der anderen Isoformen wie NCAM-120 führt (Lyles *et al.*, 1984; Hansen *et al.*, 1985; Linnemann *et al.*, 1993).

Zusätzlich zu Veränderungen der Expression des NCAM kann dessen Funktion auch über eine posttranslationale Modifikation reguliert werden, wobei durch Glykosylierung mehrere Glykoformen eines Proteins entstehen können. Neben der Phosphorylierung von Serinen und Threoninen sowie der Palmitoylierung von intrazellulären Cysteinen besitzt das NCAM im extrazellulären Teil sechs N-Glykosylierungsstellen. Davon stellen zwei in der fünften Ig-ähnlichen Domäne einen potentiellen Akzeptor für Polysialinsäure dar (Nelson *et al.*, 1995; Liedtke *et al.*, 2001; von der Ohe *et al.*, 2002) (Abb. 1.1 A), die durch die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV synthetisiert wird und zu einer Veränderung der Bindungseigenschaften des NCAM führt.

1.2 Polysialylierung des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls

1.2.1 Polysialinsäure

Polysialinsäure (*polysialic acid*; polySia) ist ein Homo- oder Heteropolymer, bestehend aus 8 bis hin zu > 200 Monomeren der Sialinsäure (< 8: Oligosialinsäure). Mit dem Begriff Sialinsäure wird eine Gruppe saurer Amino Zucker beschrieben, die aus Derivaten der Neuraminsäure besteht. Die Derivate mit der weitesten Verbreitung sind 5-*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), gefolgt von 5-*N*-Glycolyneuraminsäure (Neu5Gc) und Ketodesoxyonulonsäure (KDN) (Angata und Varki, 2002). In der Polysialinsäure sind die Monomere über α 2-8-glykosidische Bindungen verknüpft und weisen eine unverzweigte und helikale Struktur auf (Baumann *et al.*, 1993) (Abb. 1.2). Frei vorliegend zeigen Polysialinsäuren ab einer Länge von 11 Monomeren eine Tendenz

zur Ausbildung von Aggregaten, die untereinander zu Netzwerken wachsen können (Toikka *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft wurde als wichtige Voraussetzung zur Herstellung von medizinischen Materialien aus Polysialinsäure beschrieben (Berski *et al.*, 2008).

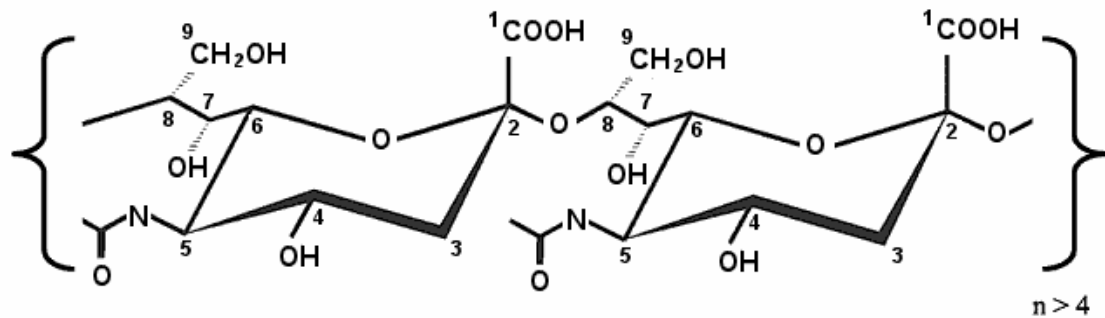


Abbildung 1.2: Strukturformel eines Dimers der α 2-8-verknüpften Polysialinsäure (polySia). Zwei Molekülreste der 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) sind über die Kohlenstoffatome 2 und 8 in einer α 2-8-glykosidischen Bindung zu einem Dimer verknüpft. Polysialinsäure besteht aus einer Kette von mindestens 8 Neu5Ac-Monomeren.

Polysialinsäuren kommen sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten vor und werden entweder an Glykolipide oder per O- oder N-Glykosylierungsstellen an Glykoproteine gebunden. Bei Prokaryoten kommen Polysialinsäuren hauptsächlich in humanpathogenen Erregern vor, wie zum Beispiel *Escherichia coli* K1, *Pasteurella haemolytica* A2 und *Neisseria meningitidis* der Gruppe B (Troy *et al.*, 1979; Puente-Polledo *et al.*, 1998). Diese bilden eine Kapsel aus auch im Wirtsorganismus vorkommender α 2-8 verknüpfter Neu5Ac, die Antigene der Erreger maskiert und auf diese Weise die Komplementaktivierung des Immunsystems verhindert (Jarvis und Vedros, 1987; Read *et al.*, 1996). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Polysialinsäure die Erreger bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke unterstützt (Hammerschmidt *et al.*, 1996). Bei den Eukaryoten sind es vor allem die Vertebraten, die Polysialinsäure aufweisen (Troy, 1995). In einzelnen Berichten wurde aber auch auf die Existenz von Polysialinsäure in Insekten (*Drosophila melanogaster*) hingewiesen (Roth *et al.*, 1992).

In Vertebraten wurde α 2-8 verknüpfte Polysialinsäure erstmals 1982 nachgewiesen (Finne, 1982) und stellte insofern eine Besonderheit dar, als das NCAM als nahezu einziger Akzeptor dafür in Erscheinung trat (Acheson *et al.*, 1991; Tomasiewicz *et al.*, 1993). Dies konnte durch eine NCAM-knockout-Maus (NCAM^{-/-}) verifiziert werden,

bei der es zum fast vollständigen Verlust der Polysialinsäure kam (Cremer *et al.*, 1994). Weitere Akzeptoren für Polysialinsäure sind der Natriumkanal im Gehirn der Ratte (Zuber *et al.*, 1992), CD36 in menschlicher Muttermilch (Yabe *et al.*, 2003), Neuropilin-2 auf humanen dendritischen Zellen (Curreli *et al.*, 2007) und SynCAM 1 (Synaptisches Zelladhäsionsmolekül 1; *synaptic cell adhesion molecule 1*) (Galuska *et al.*, 2010). Die Veränderung der Funktionalität des NCAM durch die posttranslationale Modifikation mit Polysialinsäure ergibt sich durch die Größe der Polysialinsäure, ihre negative Ladung und die daraus resultierende Bildung einer Hydrathülle. Der Komplex bewirkt somit eine Inhibition der Bindungsdomänen und letztlich eine Reduzierung der Zelladhäsion, wobei es für den genauen molekularen Mechanismus verschiedene Möglichkeiten gibt (Abb. 1.3).

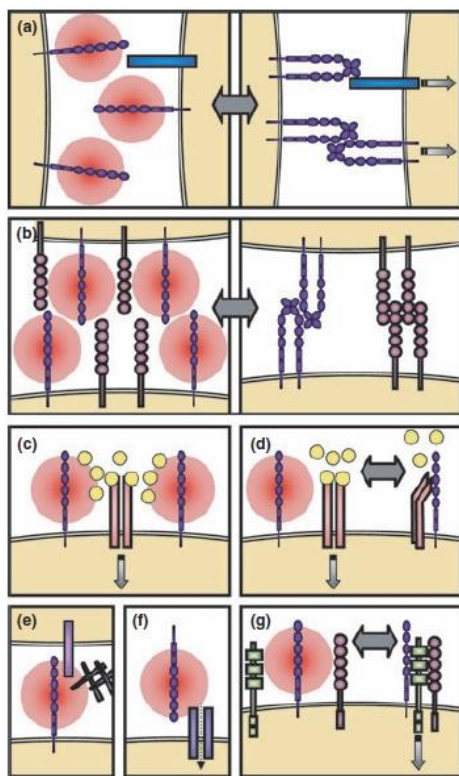


Abbildung 1.3: Verschiedene Modelle für die Wirkungsweise des polysialylierten NCAM. a) Polysialinsäure (rot) maskiert das NCAM und verhindert so dessen homo- und heterophilen Interaktionen. b) Zusätzliche Verhinderung von Interaktionen anderer Zelloberflächenmoleküle durch sterische Inhibition (Rutishauser und Landmesser, 1996; Fujimoto *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2005). c) Polysialinsäure trägt zur Interaktion löslicher Faktoren (gelb) mit Zellrezeptoren bei oder d) erlaubt die sonst inhibierte Interaktion von löslichen Faktoren mit Zellrezeptoren (Durbec und Cremer, 2001). e) Polysialinsäure bewirkt die Interaktion mit neuen Interaktionspartnern (Storms und Rutishauser, 1998; Dityatev *et al.*, 2004). f) Frei vorliegend ist durch Polysialinsäure die Modulation von Ionenkanälen möglich (Vaithianathan *et al.*, 2004; Hammond *et al.*, 2006). g) Polysialinsäure beeinflusst die Bildung von Signalkomplexen (Cavallaro *et al.*, 2001). (Hildebrandt *et al.*, 2007)

1.2.2 Polysialyltransferasen

Die in Vertebraten für die Synthese der Polysialinsäure verantwortlichen Enzyme sind die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV. Sie gehören zur Familie der Sialyltransferasen, die nach ihrer Spezifität für die jeweilige Akzeptorstruktur und dem Typ der glykosidischen Bindung (α 2-3, α 2-6, α 2-8) unterschieden werden und auf

diese Weise Glykolipide oder Glykoproteine modifizieren. ST8SiaII (früher: STX) (Livingston und Paulson, 1993; Scheidegger *et al.*, 1995; Kojima *et al.*, 1995) und ST8SiaIV (früher: PST / PST-1) (Eckhardt *et al.*, 1995; Nakayama *et al.*, 1995) werden beide im Golgi-Apparat exprimiert und synthetisieren Polysialinsäure aus Neu5Ac in α 2-8-Verknüpfung, mit einer Kettenlänge von > 50 Monomeren (Inoue *et al.*, 2000; Nakata und Troy, 2005; Galuska *et al.*, 2008). Zusätzlich zum NCAM stellen die Polysialyltransferasen selbst einen Akzeptor für Polysialinsäure dar (Mühlenhoff *et al.*, 1996a; Close und Colley 1998). Die Funktion dieses als Autopolysialylierung bezeichneten Vorgangs ist nicht vollständig belegt, doch scheint eine funktionelle Verbindung zwischen beiden Mechanismen zu existieren (Mühlenhoff *et al.*, 2001). Eine weitere Sialyltransferase, ST8SiaIII, wird aufgrund der Fähigkeit zur Autopolysialylierung ebenfalls zur Gruppe der Polysialyltransferasen gezählt (Angata *et al.*, 2000).

Sowohl ST8SiaII als auch ST8SiaIV sind in der Lage, dieselben Glykosylierungsstellen am NCAM zu benutzen, und synthetisieren auch ähnliche Polysialinsäurereste (Angata *et al.*, 1998). Dies erfolgt an bereits im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildeten N-Glykosylierungen der Aminosäure Asparagin, deren endständige *N*-Acetylneuraminsäure dann als Grundgerüst für die Synthese der Polysialinsäure dient (Mühlenhoff *et al.*, 1996b; Kojima *et al.*, 1996) (Abb. 1.4). Die N-Glykane können sich dabei in ihrem Aufbau stark unterscheiden (Kudo *et al.*, 1996; Geyer *et al.*, 2001; Wuhler *et al.*, 2003) und bestimmen damit auch über die Anzahl an synthetisierten Polysialinsäureketten (Galuska *et al.*, 2008). Die Beschränkung der Polysialylierung auf nur zwei N-Glykane in der fünften Ig-ähnlichen Domäne des NCAM beruht dagegen nicht auf dessen Struktur: Im Golgi-Apparat, das heißt im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), kommt es für die Synthese der Polysialinsäure zur spezifischen Bindung zwischen dem NCAM und der Polysialyltransferase über die erste Fibronectin-Typ-(III)-Domäne, sodass die anderen N-Glykane nicht als Akzeptor auftreten können (Close *et al.*, 2003; Mendiratta *et al.*, 2006). Nach der Polysialylierung wird das NCAM entlang des sekretorischen Wegs an die Zelloberfläche transportiert, während die Polysialyltransferasen im Golgi-Apparat verbleiben (Kiss *et al.*, 1994; Kojima *et al.*, 1997).

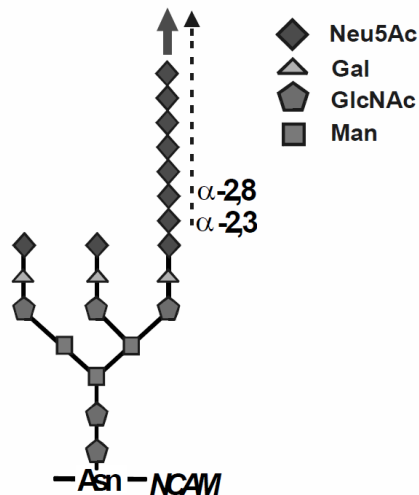


Abbildung 1.4: Beispiel der Polysialinsäuresynthese an einem NCAM-Glykan. N-glykosidisch an einem Asparaginrest (Asn) des NCAM gebundene Glykanstruktur, bestehend aus N-Acetylglucosaminen (GlcNAc), Mannose (Man), Galaktose (Gal) und 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Nach dem ersten α 2,3- (oder α 2,6-) gebundenen Neu5Ac-Molekül erfolgt der Aufbau der Polysialinsäure in α 2,8-glykosidischer Bindung. (Mühlenhoff *et al.*, 1996b)

Die Polysialyltransferasen sind hinsichtlich ihrer Primärstruktur hoch konserviert (59 % identische Aminosäure-Sequenz). Als Transmembranproteine des Typs II bestehen sie aus einem kurzen zytoplasmatischen N-Terminus, einer Transmembrandomäne und einer im Lumen des Golgi-Apparats befindlichen C-terminalen Domäne. Diese enthält ein L-Motiv (*sialylmotif long*), ein S-Motiv (*sialylmotif short*) sowie ein VS-Motiv (*sialylmotif very short*), welche in Sialyltransferasen die enzymatisch aktiven Regionen für den Transfer von Sialinsäuren auf ein Glykoprotein darstellen (Datta und Paulson, 1995; Datta *et al.*, 1998). ST8SiaII weist eine molekulare Masse von 60 kDa auf, ST8SiaIV dagegen eine von 55 kDa. Beide Polysialyltransferasen werden gewebe- und zelltypspezifisch exprimiert, folgen in der Entwicklung aber noch weitgehend dem gleichen Expressionsmuster, während im adulten Organismus meist nur noch ST8SiaIV vorliegt (Hildebrandt *et al.*, 1998; Oltmann-Norden *et al.*, 2008). Die Regulation der Expression erfolgt unabhängig voneinander über die Transkription auf mRNA-Ebene (Hildebrandt *et al.*, 1998; Seidenfaden *et al.*, 2000), wobei der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist. Entdeckt wurden in dem Zusammenhang spezifische Regulationselemente (Yoshida *et al.*, 1996; Eckhardt und Gerardy-Schahn, 1998; Takashima *et al.*, 1998) sowie die Beeinflussung der Transkription durch Retinol- und Valproinsäure (Seidenfaden und Hildebrandt, 2001; Beecken *et al.*, 2005). Das Zusammenspiel beider Polysialyltransferasen bestimmt die Gesamtmenge an Polysialinsäure im Organismus, ihre Kettenlänge, das Verhältnis von polysialyliertem zu nicht polysialyliertem NCAM und die Menge an Polysialinsäure an einem einzelnen NCAM (Galuska *et al.*, 2006). Der Verlust einer der beiden Polysialyltransferasen führt nur zu einer teilweisen Reduzierung der Polysialylierung in ST8SiaII^{-/-}- und ST8SiaIV^{-/-}-Mäusen (Eckhardt *et al.*, 2000; Angata *et al.*, 2004), trotzdem sind dabei unterschied-

liche Phänotypen zu beobachten: Die Deletion von ST8SiaIV betrifft größtenteils den adulten Organismus (Eckhardt *et al.*, 2000; Markram *et al.*, 2007), während ST8SiaII^{-/-}-Mäuse Defizite in der Entwicklung erkennen lassen (Angata *et al.*, 2004; Stoenica *et al.*, 2006), sodass dort von einer dominanten Rolle der ST8SiaII ausgegangen werden kann.

1.2.3 Vorkommen von polysialyliertem NCAM

In der Embryonalentwicklung von Säugetieren werden die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV gleichzeitig exprimiert und das NCAM liegt dementsprechend fast vollständig polysialyliert vor. Die Anwesenheit von Polysialinsäure geht dabei ausschließlich mit der Expression der Polysialyltransferasen einher, wobei der umgekehrte Fall, also die Expression der Polysialyltransferasen ohne Polysialinsäure, durchaus vorzukommen scheint (Phillips *et al.*, 1997). Neben der transkriptionellen Regulierung der Expression des polysialylierten NCAM gibt es daher auch Hinweise auf weitere Regulierungsmechanismen, wie zum Beispiel die Abhängigkeit von Kalzium bei der Exozytose (Bruses und Rutishauser, 1998) und der Proteinkinase C für die Aktivität der Enzyme (Gallagher *et al.*, 2000; Gallagher *et al.*, 2001). Eine differenzierte Expression beider Polysialyltransferasen während der Embryonalentwicklung kann im Gegensatz zum adulten Organismus durch die gleichzeitige Funktion schwerer nachgewiesen werden, doch zeigt sich für ST8SiaII eine stärkere Expression als für ST8SiaIV (Kurosawa *et al.*, 1997; Angata *et al.*, 1997; Hildebrandt *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1998; Oltmann-Norden *et al.*, 2008).

Unmittelbar nach dem Beginn der Expression des NCAM im Neuroektoderm und Mesoderm zwischen Tag 7 und 8 in der Maus (Wells und Melton, 2000) beginnt auch die Expression der Polysialyltransferasen (Ong *et al.*, 1998), wodurch schon zwischen Tag 8 und 9 Polysialinsäure im Embryo nachzuweisen ist (Probstmeier *et al.*, 1994). Im Folgenden startet auch in weiteren Geweben die Expression des NCAM, wobei die höchste Konzentration stets im Ektoderm, welches das Neuralrohr und die Gehirnanlage hervorbringt, nachzuweisen ist. Zu den weiteren Orten zählen die Somiten, verschiedene mesenchymale Gewebe sowie das Herz (Probstmeier *et al.*, 1994). In der Ratte folgen auch endodermale Gewebe des Magen-Darm-Traktes und der Lunge (Lackie *et al.*, 1994). Gegen Ende der Embryonalphase wird das NCAM auch in der Nasenhöhle, der Urniere und auf Zellen der Zunge, des Darmes und des Pankreas

exprimiert (Ong *et al.*, 1998). Das Maximum an polysialyliertem NCAM lässt sich in der perinatalen Phase nachweisen und dauert bis ca. Tag 9 nach der Geburt (Galuska *et al.*, 2006, Oltmann-Norden *et al.*, 2008). Mit Beginn der postnatalen Entwicklung des Gehirns reduziert sich die Anwesenheit von Polysialinsäure rapide innerhalb weniger Wochen (Edelman *et al.*, 1982; Rothbard *et al.*, 1982), korrelierend mit der gleichfalls abnehmenden Expression der Polysialyltransferasen (Oltmann-Norden *et al.*, 2008). In dieser Zeit treten die Isoformen NCAM-140 und NCAM-180 erstmals wieder ohne Polysialinsäure auf, die Expression von NCAM-120 beginnt, und in der Folge ist im adulten Organismus nur noch wenig Polysialinsäure nachzuweisen. Während die Polysialyltransferase ST8SiaII hier kaum mehr vorhanden scheint, repräsentiert ST8SiaIV die nun dominierende Variante (Hildebrandt *et al.*, 1998). Das NCAM kommt im adulten Organismus zwar noch auf zahlreichen Zellarten vor, doch ist die Anwesenheit von polysialyliertem NCAM hier stark reduziert und auf wenige Regionen beschränkt. Zellen mit Expression des NCAM sind unter anderem Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten, Schwann'sche Zellen und Muskelzellen. Polysialinsäure tritt dagegen nur noch in Bereichen auf, die eine Plastizität aufweisen, wie zum Beispiel in neurosekretorischen Neuronen des Hypothalamus-Hypophysensystems (Theodosis *et al.*, 1991), der Region der Hippocampusformation (Seki und Rutishauser, 1998; Becker *et al.*, 1996) und in Neuroblasten des Bulbus olfactorius (Eckhardt *et al.*, 2000).

1.2.4 Funktion des polysialylierten NCAM

Frühe Untersuchungen gaben die ersten Hinweise auf die Bedeutung des NCAM und dessen Polysialylierung: Eine durch eine Mutation verursachte abnormal starke Polysialylierung lässt eine weitere Isoform des NCAM entstehen, woraus eine gestörte Wanderung von Neuralleistenzellen resultiert, die zu zahlreichen Defekten unter anderem des Gehirns bis hin zur Embryoletalität führt (Neale und Trasler, 1994). In einer anderen Arbeit zeigt sich eine Fehlbildung des Neuralrohrs durch den Einsatz blockierender Antikörper gegen das NCAM (Bronner-Fraser *et al.*, 1992). Spontane Neuralrohrdefekte scheinen auf der übermäßig starken und abweichend verteilten Expression des NCAM zu beruhen (Newgreen *et al.*, 1997). Wird durch gezielte Mutation membrangebundenes NCAM durch die lösliche Variante ersetzt, sterben die Tiere bereits in der Embryonalentwicklung (Rabinowitz *et al.*, 1996).

Die Entwicklung der NCAM^{-/-}-Maus zeigt, dass die entsprechenden Tiere auch ohne NCAM lebensfähig sind und so gut wie keine Polysialinsäure mehr aufweisen. Ihr Phänotyp äußert sich hauptsächlich über ein geringeres Gehirngewicht und einen verkleinerten Bulbus olfactorius. Im Verhalten zeigt sich ein reduziertes Lernvermögen (Cremer *et al.*, 1994), gesteigertes Angstverhalten (Stork *et al.*, 1999), erhöhte Aggressivität und verringerter Erkundungsdrang (Stork *et al.*, 1997). Weitere Effekte sind die Störung der synaptischen Plastizität in Reaktion auf elektrische Reize (Cremer *et al.*, 1998), der zirkadianen Rhythmik (Shen *et al.*, 2001) sowie Projektionsfehler von korticospinalen Axonen, verkleinerte motorische Endplatten und eine defekte Laminierung von Moosfasern des Hippocampus (Moscoso *et al.*, 1998; Rolf *et al.*, 2002; Seki und Rutishauser, 1998). Durch gezielte Injektion des Enzyms Endo-N-Acylneuraminidase (Endoneuraminidase N; Endo-N), einer Endosialidase aus Bakteriophagen, die Polysialinsäure entfernen kann (Vimr *et al.*, 1984; Gerardy-Schahn *et al.*, 1995), können einige der Effekte auch in Mäusen ohne NCAM-*knockout* gezeigt werden (Ono *et al.*, 1997; Seki und Rutishauser, 1998). Bezüglich des Lernverhaltens zeigt sich in Ratten Ähnliches auch bei der Verabreichung eines anti-NCAM Antikörpers (Doyle *et al.*, 1992) oder durch die Blockade des NCAM mit Liganden (Foley *et al.*, 2000).

ST8SiaII^{-/-}/ST8SiaIV^{-/-}-Mäuse zeigen mit einem verkleinerten Bulbus olfactorius und einer defekten Laminierung von Moosfasern des Hippocampus die gleichen Phänotypen wie die NCAM^{-/-}-Maus. Darüber hinaus kommt es zu zahlreichen weiteren Defekten in der Entwicklung, wie der Bildung eines Hydrocephalus, Missbildungen im Gehirn sowie einer Störung des Wachstums, die insgesamt in einer hohen Sterblichkeitsrate in der postnatalen Phase resultieren (Weinhold *et al.*, 2005). ST8SiaII^{-/-}-Mäuse weisen ebenso eine anormale Struktur der Moosfasern des Hippocampus auf (Angata *et al.*, 2004), während bei ST8SiaIV^{-/-}-Mäusen eine beeinträchtigte synaptische Plastizität im Hippocampus auftritt, aber ohne erkennbare morphologische Defekte (Eckhardt *et al.*, 2000). Beide Beobachtungen stehen damit im Einklang mit der dominierenden Rolle der jeweiligen Polysialyltransferase in der Entwicklung und im adulten Organismus.

Weil ST8SiaII^{-/-}/ST8SiaIV^{-/-}-Mäuse teilweise den gleichen Phänotyp wie NCAM^{-/-}-Mäuse aufweisen und einige der Effekte von fehlendem NCAM in adulten Tieren durch Entfernung der Polysialinsäure reproduziert werden können, ist davon auszugehen, dass

die Anwesenheit von nicht polysialyliertem NCAM hier den ausschlaggebenden Faktor darstellt. Bestätigt wurde dies durch die Beobachtung, dass die schweren Defekte der ST8SiaII^{-/-}/ST8SiaIV^{-/-}-Mäuse durch eine zusätzlich verhinderte Expression des NCAM wieder neutralisiert werden können (Angata *et al.*, 2007). Die Funktionalität von polysialyliertem NCAM beruht also hauptsächlich auf der zeitlich korrekten Regulierung der NCAM-Interaktionen durch Polysialylierung sowie dessen Einflussnahme auf andere Proteine. Dieses System steuert die Entwicklung des Nervensystems sowie des Gehirns und erhält die Plastizität im adulten Organismus in Bereichen, die mit Lern- und Gedächtnisleistung assoziiert sind, sowie des endokrinen Systems.

1.2.5 Krebs und Metastasierung

Neben den wenigen, aber physiologisch bedeutsamen Bereichen im adulten Organismus kann eine Polysialylierung des NCAM auch bei verschiedenen Tumorarten nachgewiesen werden und dient in diesem Zusammenhang in einigen Fällen als klinischer Marker (Fuster und Esko, 2005). Zu den Tumoren mit Expression von polysialyliertem NCAM gehören unter anderem der Wilms-Tumor bzw. das Nephroblastom (Roth *et al.*, 1988), das Schwannom (Figarella-Branger *et al.*, 1990), das periphere T-Zelllymphom (Kern *et al.*, 1992), das multiple Myelom (Kaiser *et al.*, 1996), das Neuroblastom und Rhabdomyosarkom (Glüer *et al.*, 1998a; Glüer *et al.*, 1998b), der Beta-Zelltumor des Pankreas (Perl *et al.*, 1999), das kleinzellige sowie nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (Komminoth *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 2000) und das Hypophysenadenom (Troullias *et al.*, 2003).

Die Tumorgenese umfasst im Allgemeinen einige Änderungen der genetischen Eigenschaften einer Zelle und ist ein mehrstufiger Prozess. Zu Beginn muss eine Zelle sowohl eine Insensitivität gegen anti-Proliferationssignale des Organismus als auch die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren sicherstellen. Darüber hinaus muss sie der Apoptose entgehen. Die Transformation eines benignen (gutartigen) zu einem malignen (bösartigen) Tumor benötigt zusätzlich noch ein grenzenloses Replikationsvermögen der Zellen, anhaltende Angiogenese und die Fähigkeit, in bestehendes Gewebe einzudringen und Metastasen zu bilden (Hanahan und Weinberg, 2000) (Abb. 1.5).

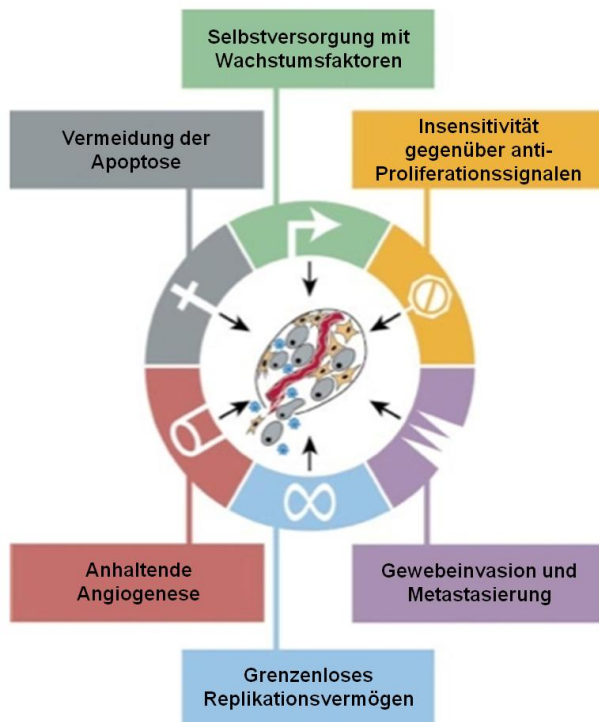


Abbildung 1.5: Eigenschaften eines Tumors.

Zu den Eigenschaften von Tumorzellen gehören die Insensitivität gegenüber anti-Proliferationsignalen des Organismus, die Eigenproduktion von Wachstumsfaktoren und die Vermeidung der Apoptose. In einem malignen Tumor erweitert sich dies um ein grenzenloses Replikationsvermögen, anhaltende Angiogenese und Metastasierung. (modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2000)

Die Metastasierung selbst hängt dabei auch von mehreren Voraussetzungen ab, die nicht nur Änderungen der Tumorzellen beinhalten, sondern auch durch die Tumorumgebung bedingt sind (Kopfstein und Christofori, 2006). Ab einer gewissen Größe benötigt der Tumor eine eigene Versorgung mit Blutgefäßen, um das weitere Wachstum und die Zufuhr von Nährstoffen zu sichern. Dazu werden von den Tumorzellen Faktoren für die Angiogenese produziert, während die das Gegenteil bewirkenden Faktoren unterdrückt werden. Neben der Versorgung der Tumorzellen begünstigt der Aufbau einer eigenen Blutversorgung auch die hämatogene Ausbreitung von Tumorzellen (Fidler, 2002; Ahmad und Hart, 1997). Darüber hinaus sekretieren endotheliale Blutgefäßzellen (*blood vessel endothelial cells*; BVEC) weitere Wachstumsfaktoren für den Tumor und dessen Lymphangiogenese (Cao, 2005). Um nun vom Tumor zu dissoziieren, müssen polarisierte epitheliale Tumorzellen konvertiert werden, damit sie einen fibroblastoiden, migratorischen und invasiven Phänotyp aufweisen (Epithelial-mesenchymale Transition, EMT). Weiterhin müssen sie in die extrazelluläre Matrix gelangen, in das vaskuläre oder lymphoide Gewebe des Tumors eindringen (Intravasion), dem Immunsystem widerstehen und während der Zirkulation und an ihrem Zielort weiter proliferieren und überleben. Dabei spielen Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Neben diesen tragen aber auch Zellen der Tumorumgebung zur Metastasierung bei, wie zum Beispiel Tumor-assoziierte Makrophagen oder Karzinom-

assoziierte Fibroblasten. Sie produzieren und sekretieren Faktoren, Matrix-Metalloproteinasen und Zytokine, die unter anderem dazu beitragen, die extrazelluläre Matrix umzubauen sowie die Immuntoleranz von Zellen, ihr Überleben und ihre Invasionsfähigkeit zu verändern (Bogenrieder und Herlyn, 2003; Fidler, 2002; Ahmad und Hart, 1997, Kopfstein und Christofori, 2006) (Abb. 1.6).



Abbildung 1.6: Metastasierung. Durch die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) wandeln sich polarisierte epitheliale Zellen in invasive mesenchymale Tumorzellen um. Diese dringen in Blut- oder Lymphgefäße ein (Intravasion), zirkulieren im Organismus und bleiben schließlich in Mikrogefäßen hängen. Dort verlassen sie die Gefäße (Extravasion) und durchlaufen einen zur EMT umgekehrten Prozess, die Mesenchymal-epitheliale Transition (MET), sodass sich erst Mikrometastasen und in der Folge Metastasen bilden. (modifiziert nach Weinberg, 2006)

Ein Beispiel für die Abhängigkeit der Metastasierungsfähigkeit von Zelladhäsionsmolekülen ist das in diesem Zusammenhang gut studierte E-Cadherin aus der Familie der Cadherine. Es ist maßgeblich beteiligt an der Steuerung der Zellpolarität und der Organisation von epithelialen Zellen (Gumbiner, 2005). Eine Reduzierung der von E-Cadherin erzeugten Zell-Zell-Adhäsion geht einher mit einer erhöhten Malignität von Tumorzellen. So verursacht die Überexpression von E-Cadherin in Tumorzellen einen Wiederaufbau der Zellkontakte und die Wandlung von einem invasiven, mesenchymalen zu einem epithelialen Phänotyp (Vleminckx *et al.*, 1991). Der zugrunde liegende Mechanismus findet seine natürliche Anwendung während der Embryonalentwicklung, bei Entzündungen, der Gewebeorganisation und der Wundheilung (Grunert *et al.*, 2003). In allen Fällen wird die Expression epithelialer Marker wie E-Cadherin reduziert und die mesenchymale erhöht, wie zum Beispiel N-Cadherin und Vimentin (Thiery, 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass zwischen der reduzierten Expression des E-Cadherins und der erhöhten Expression des NCAM ein direkter, sich bedingender Zusammenhang besteht (Lehembre *et al.*, 2008). Poly-

sialyliertes NCAM kann außerdem mit E-Cadherin interagieren und auf diese Weise die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zusätzlich reduzieren (Schreiber *et al.*, 2008).

Die Polysialylierung des NCAM zeigt ähnliche Effekte wie die reduzierte Expression von E-Cadherin, die insbesondere in der Embryonalentwicklung von Bedeutung sind. Entsprechend korreliert die Malignität der Tumore neben E-Cadherin auch mit der Expression des polysialylierten NCAM (Scheidegger *et al.*, 1994; Daniel *et al.*, 2000; Daniel *et al.*, 2001; Trouillas *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2005) bzw. das Metastasierungspotential generell mit der Sialylierung von Kohlenhydratstrukturen (Bresalier *et al.*, 1996). Anhand des Astrozytoms sowie des kolorektalen und pankreatischen Karzinoms konnte gezeigt werden, dass der komplette Verlust des NCAM die Malignität der Tumore ebenso erhöht wie die Expression der polysialylierten Form, wodurch sich ein ähnlicher Zusammenhang wie in der Embryonalentwicklung ergibt (Edvardsen *et al.*, 1994; Fogar *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1998; Perl *et al.*, 1999; Huerta *et al.*, 2001). Im Fall des Rhabdomyosarkoms gelang 2001 der direkte Nachweis, dass die Modifikation des NCAM mit Polysialinsäure die Metastasierung *in vivo* fördert. Durch regelmäßige Injektionen des Enzyms Endo-N in das Tumorgewebe und der damit einhergehenden Entfernung der Polysialinsäure, konnte eine Reduzierung der Metastasenanzahl in Leber und Lunge erreicht werden (Daniel *et al.*, 2001).

1.3 Antikörper und Intrabodies

1.3.1 Antikörper

Antikörper (Immunglobuline; Ig) gehören zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und sind Teil des adaptiven Immunsystems der Vertebraten. Sie werden von B-Lymphozyten produziert und auf ihrer Zelloberfläche als Rezeptoren präsentiert oder von differenzierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) sekretiert, wodurch sie im Blut und anderen extrazellulären Flüssigkeiten aufzufinden sind. Antikörper sind Proteine, die mit einer hohen Affinität und Spezifität bestimmte Makromoleküle (Epitope) erkennen und binden können, wie zum Beispiel Bestandteile von Viren, Bakterien, Pilzen und Toxinen. Sie weisen einen Y-förmigen Aufbau auf, welcher sich aus je zwei identischen

leichten und schweren Polypeptidketten ergibt, die über Disulfid- und Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten besitzen eine N-terminale variable und eine C-terminale konstante Domäne (V_L und C_L), die schweren Ketten dagegen eine variable sowie drei konstante Domänen (V_H und C_{H1-3}) (Abb. 1.7). Die variablen Domänen erhalten ihre Flexibilität durch unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten der Gensegmente des Antikörpers sowie somatischen Hypermutationen und fungieren somit als Antigenbindungsstelle, bei denen drei Komplementarität-bestimmende Regionen (*complementarity determining regions*, CDR) innerhalb der Domänen die Bindungstaschen formen. Die konstanten Domänen der schweren Ketten bestimmen dagegen den Isotyp sowie die Effektorfunktion und damit über den Wirkungsort und die daraus resultierenden Aufgaben des Antikörpers. Es gibt fünf verschiedene Isotypen mit weiteren Unterklassen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (zusätzlich IgY in Hühnern und IgW in einer Haiart und diversen Lungenfischen), wobei IgG den häufigsten und langlebigsten Isotyp ausmacht.

Antikörper werden klassischerweise durch Immunisierung von Versuchstieren gewonnen. Dazu wird das Antigen, gegen das ein Antikörper benötigt wird, in ein Versuchstier injiziert und der daraufhin gebildete Antikörper aus dem Blutplasma isoliert. So gewonnene Antikörper sind polyklonal, das heißt, man erhält eine Mischung aus verschiedenen Antikörpern die unterschiedliche Epitope des Antigens erkennen. Monoklonale Antikörper hingegen, die nur gegen ein Epitop gerichtet sind, werden durch Isolierung und Klonierung von Plasmazellen gewonnen, sodass nur noch ein bestimmter Antikörper produziert wird. Durch Fusion der Plasmazellen mit Myeloma-Zellen (B-Zell-Karzinom) zu einer Hybridzelllinie (Hybridoma) wird die andauernde Kultivierung der Zellen und Produktion des Antikörpers ermöglicht.

Rekombinante Antikörper schließlich werden *in vitro* gentechnologisch, ausgehend von der mRNA bzw. cDNA eines Hybridoms, hergestellt. Eine andere Methode stellt die Phagen Display-Technologie dar, bei der aus Plasmazellen die mRNA/cDNA isoliert und die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der variablen Domänen per Bakteriophagen präsentiert werden. Durch Überprüfung der Bindung zum Antigen (*biopanning*) können so gezielt geeignete rekombinante Antikörper selektioniert werden. Auf diese Weise können aus synthetischen Antikörper-Phagen-Bibliotheken auch humane Antikörper ohne Immunisierung isoliert werden. Zu den rekombinanten

Antikörpern gehört unter anderem das Antigen-bindende Fragment (Fab; *Fragment antigen binding*), bei dem nur noch die variable und konstante Domäne der leichten Kette (V_L und C_L) mit der variablen und einer der konstanten Domänen der schweren Kette (V_H und C_{H1}) verbunden ist. Beim variablen Fragment (Fv; *Fragment variable*) dagegen sind nur noch die beiden variablen Domänen der leichten und der schweren Kette (V_L und V_H) vorhanden, welche aus Stabilitätsgründen normalerweise über eine synthetische Polypeptidbrücke (*linker*) verbunden sind und auf diese Weise einen Einzelkettenantikörper bilden (scFv; *single chain Fragment variable*) (Abb. 1.7). Die Polypeptidbrücke besteht meist aus dem sich dreimal wiederholenden Motiv von vier Glycinen und einem Serin ((Gly₄Ser)₃).

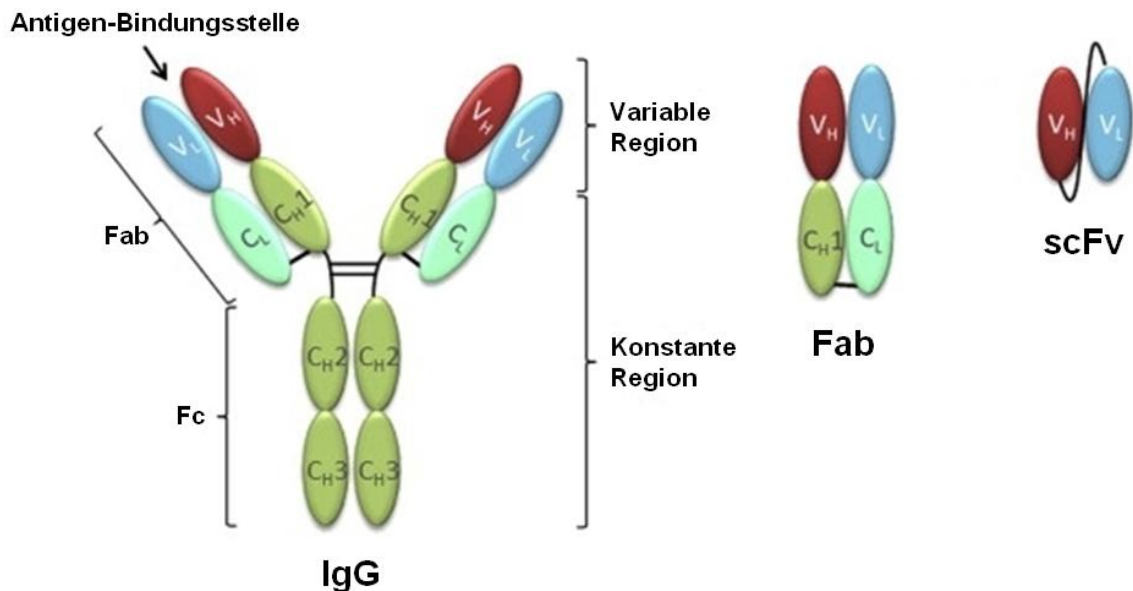


Abbildung 1.7: Struktur eines Antikörpers sowie der rekombinanten Formen Fab und scFv. Ein Antikörper besteht aus je zwei leichten und schweren Ketten, welche wiederum aus einer variablen und einer konstanten (V_L , C_L) bzw. einer variablen und drei konstanten Domänen (V_H , C_{H1-3}) zusammengesetzt sind. Die variablen Domänen bilden die Antigen-Bindungsstelle. Die rekombinante Form Fab (*Fragment antigen binding*) ist um den Fc-Teil bestehend aus C_{H2-3} gekürzt (*Fragment crystallizable*). Die rekombinante Form scFv (*single chain Fragment variable*) besteht nur noch aus den variablen Domänen, die über eine Polypeptidbrücke verbunden sind. (modifiziert nach Safarnejad *et al.*, 2011)

1.3.2 Intrabodies

Intrabodies sind Antikörper, die intrazellulär ihr Antigen binden (*intracellular antibody* = *intrabody*) und in bestimmten Kompartimenten der Zelle verbleiben statt sekretiert zu

werden (Kontermann, 2004). Da sie auf natürliche Weise nicht vorkommen, handelt es sich dabei immer um rekombinante Antikörper, die in der Fab- oder scFv-Form synthetisiert werden. Dabei wird meist das kleinere scFv bevorzugt (Persic *et al.*, 1997). Für die Herstellung kann die cDNA der variablen Domänen der schweren und leichten Kette aus dem monoklonalen Originalantikörper sowie die *linker*-DNA amplifiziert und als scFv kloniert werden (Lobato und Rabbitts, 2003), wobei die Proteinsequenz des *linker* die Stabilität des Intrabody beeinflussen kann (Hust *et al.*, 2007). Durch Inhibition des Antigens, Bindung an einzelne Proteindomänen oder auch Veränderungen des Transports oder der Proteinfaltung kann ein Intrabody neben der bloßen Bindung auch dazu eingesetzt werden, sein Antigen zu neutralisieren oder zu modifizieren (Peng *et al.*, 2007).

Da die Möglichkeiten, Intrabodies als komplette Proteine in eine Zelle zu dirigieren, beschränkt sind, müssen sie in der entsprechenden Zelle exprimiert werden. Dabei kann der N-Terminus einer scFv-Sequenz mit einem Signalpeptid (*leader*) versehen werden, welches wie bei natürlich vorkommenden Proteinen den Intrabody zu einem bestimmten Zellkompartiment leitet, wie zum Beispiel das Endoplasmatische Retikulum (ER) (Beerli *et al.*, 1994), der Nukleus, die Mitochondrien, das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) oder auch die Plasmamembran (Persic *et al.*, 1997). Geschieht dies nicht, so sammelt sich der Intrabody im Zytoplasma (Cardinale *et al.*, 2004). C-terminal kann der Intrabody zwecks Detektion oder Aufreinigung mit einer kurzen Aminosäuresequenz (Detektions-Tag) versehen werden.

Das ER eignet sich besonders als Zielort für die Intrabody-Expression (ER-Intrabodies), da dort Chaperone sowie die oxidierende Umgebung dessen korrekte Faltung ermöglichen (Marasco, 1995), im Gegensatz zur reduzierenden Umgebung des Zytoplasmas (Lobato und Rabbitts, 2003). Weiterhin findet im ER der Transport von sekretorischen Proteinen und Transmembranproteinen sowie die posttranslationale Modifikation der meisten Proteine statt, sodass hier die Wahrscheinlichkeit hoch ist, auf das jeweilige Antigen zu treffen (Richardson *et al.*, 1995). Durch ER-Intrabodies können diese Proteine im ER gehalten werden, wodurch die Translokation zu ihrem natürlichen Zielort verhindert wird (Lo *et al.*, 2008). Zu diesem Zweck werden ER-Intrabodies neben der N-terminalen Zielsequenz am C-Terminus um eine ER-Retentionssequenz erweitert, um den Intrabody gemeinsam mit seinem Antigen im

Lumen des ER zurückzuhalten. Dazu eignet sich das Tetrapeptid KDEL (Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin) oder das erweiterte SEKDEL (Serin-Glutaminsäure-Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin), welches eine Bindung an den im ER befindlichen KDEL-Rezeptor (in humanen Zellen: hERD2) bewirkt (Munro und Pelham, 1987). Dieser sorgt nach Abschnürung eines Vesikels vom ER und Fusion mit dem *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN) für den vesikulären Rücktransport des Komplexes aus Rezeptor, Intrabody sowie Antigen und damit für dessen Verbleib im ER (Abb. 1.8).

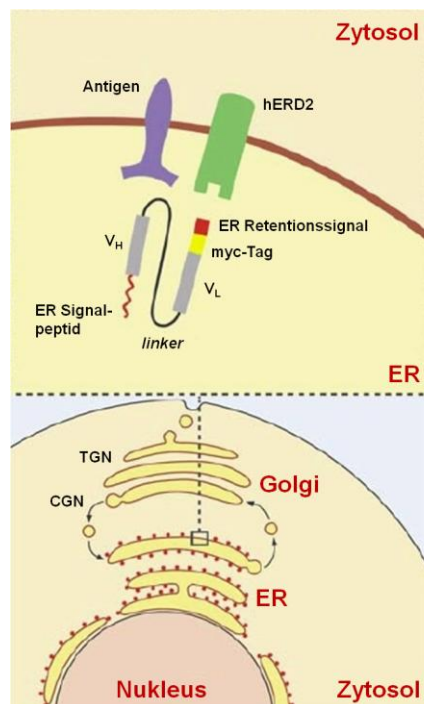


Abbildung 1.8: Struktur und Funktionsweise eines ER-Intrabody. Oben: Ein ER-Intrabody besteht aus einem N-terminalen ER-Signalpeptid, der variablen Domäne der schweren Kette V_H , einer Polypeptidbrücke (*linker*), der variablen Domäne der leichten Kette V_L , einem Detektions-Tag (hier: myc) und einem C-terminalen ER-Retentionssignal. Das Signalpeptid führt zur Expression des Intrabody im ER, in welchem über die variablen Domänen das Zielantigen gebunden wird. Neben diesem wird über das Retentionssignal der KDEL-Rezeptor (hier: hERD2) gebunden. Unten: Der Komplex aus Antigen, Intrabody und Rezeptor wird nach vesikulärem Transport in das *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN) wieder zurück in das ER transportiert. (modifiziert nach Böldicke, 2007)

1.3.3 Anwendung von Intrabodies

Die erstmalige Anwendung eines Intrabody war die Neutralisierung der Alkohol-Dehydrogenase I in *Saccharomyces cerevisiae* (Carlson, 1988). Später wurde erstmals die Anwendung von intrazellulären Antikörpern in Säugetierzellen beschrieben (Biocca *et al.*, 1990; Werge *et al.*, 1990) sowie der Begriff Intrabody geprägt (Chen *et al.*, 1994). Es folgte eine Reihe weiterer Intrabodies: In der Onkologie konnte beispielsweise das in Tumorzellen überexprimierte ErbB-2 (Erythroblastose Homolog B2; Deshane *et al.*, 1994; Beerli *et al.*, 1994) blockiert werden, wodurch die Apoptose der Tumorzellen eingeleitet wurde. Weiterhin konnte die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (Richardson *et al.*, 1995) sowie der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*; Jannot *et al.*, 1996) inhibiert werden. Ein

Intrabody gegen p21^{ras} (Rattensarkom; Cochet *et al.*, 1998) führte zur Hemmung des Ras-Signalwegs, der das Zellwachstum und die Zellteilung bedingt. In der Virusforschung konnten alleine für das humane Immunschwächevirus 1 (HIV-1) bis zu 15 Bestandteile der Virusproduktion mit Intrabodies blockiert werden (darunter Struktur- sowie regulative Proteine, ebenso Enzyme), wodurch die Produktion des Virus in den Wirtszellen verhindert wurde (Rondon *et al.*, 1997). Darunter befinden sich unter anderem das Glykoprotein 120 (gp120; Marasco *et al.*, 1993), das Transaktivatorprotein (Tat; Mhashikar *et al.*, 1995) und später auch das Glykoprotein 160 (gp160; Zhou *et al.*, 1998). Weitere Beispiele für die Anwendung von Intrabodies betreffen die Oberflächenexpression des Integrins VLA-4 (*very late antigen-4*; Yuan *et al.*, 1996), ein Intrabody in Pflanzen gegen das Sekret des Wurzelknoten-Nematoden *Meloidogyne incognita* (Rosso *et al.*, 1996) und die alpha 1,3-Galactosyltransferase (Sepp *et al.*, 1999).

Neben diesen frühen Beispielen gibt es bis heute eine zunehmende Anzahl an weiteren erfolgreich eingesetzten Intrabodies (Tab. 1.1). Die Intrabody-Technologie hat sich daher mittlerweile als eine erfolgreiche Alternative zu anderen *knockout*- und *knockdown*-Techniken (zum Beispiel Mutagenese, Homologe Rekombination, *anti-sense*-RNA, RNA-Interferenz, *small molecule inhibitors*) etabliert und findet ihre Anwendung hauptsächlich in medizinisch relevanten Bereichen wie der Immunologie. So sind Ansätze zu einer medikamentösen Behandlung von Krebs, AIDS, Hepatitis, Parkinson, Alzheimer, Erkrankungen mit Prionen sowie von weiteren bakteriellen und viralen Erkrankungen in der Entwicklung (Böldicke, 2007). Die Nutzung von Intrabodies *in vitro* und *in vivo* ist dabei je nach Zelltyp und Organismus von der Effizienz des spezifischen Gentransfers abhängig, zum Beispiel durch virale Vektoren. Die medizinische Anwendung bedingt daher neben der Lösung ethischer Probleme aufgrund des gentechnologischen Ansatzes auch die Entwicklung neuer Methoden für den Gentransfer. So wurde bereits in einer klinischen Studie der ErbB2-Intrabody per Adenovirus bei der Behandlung von Ovarialkarzinomen eingesetzt, doch konnten dabei durch die geringe Transduktionseffizienz keine nennenswerten Erfolge erzielt werden (Alvarez *et al.*, 2000).

Tabelle 1.1: Auswahl einiger Intrabody-Antigene der jüngeren Zeit.

| Antigen | Literatur |
|--|---|
| <i>Onkogene Proteine</i> | |
| Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2 (<i>vascular endothelial growth factor receptor 2 / kinase insert domain receptor</i> ; VEGFR-2/KDR) | Wheeler <i>et al.</i> , 2003 Böldicke <i>et al.</i> , 2005 |
| Tyrosinkinase mit Immunglobulin- und EGF-ähnlichen Domänen 2 (Tie-2) | Popkov <i>et al.</i> , 2005 |
| VEGFR-2 und Tie-2 | Jendreyko <i>et al.</i> , 2003 |
| Alpha Folat-Rezeptor (α FR) | Figini <i>et al.</i> , 2003 |
| Cathepsin L | Guillaume-Rousselet <i>et al.</i> , 2002 |
| Matrix-Metalloproteinase 2 und 9 (MMP-2 / MMP-9) | Wang <i>et al.</i> , 2000 |
| Neurales Zelladhäsionsmolekül (<i>neural cell adhesion molecule</i> ; NCAM) | Böldicke <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Virale Proteine und Wirtszellrezeptoren</i> | |
| CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) | Steinberger <i>et al.</i> , 2000 |
| CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) | BouHamdan <i>et al.</i> , 2001 |
| Viraler Infektivitätsfaktor (Vif) | Goncalves <i>et al.</i> , 2002 |
| Hepatitis-C-Virus (HCV) Kernprotein | Heintges <i>et al.</i> , 1999 Karthe <i>et al.</i> , 2008 |
| Maedi-Visna-Virus (MVV) Glykoprotein 46 (gp46) | Blazek <i>et al.</i> , 2004 |
| Hepatitis-B-Virus (HBV) Oberflächenprotein (<i>hepatitis B surface antigen</i> ; HBsAg) | Serruys <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Rezeptoren des Immunsystems</i> | |
| Haupthistokompatibilitätskomplex I (<i>major histocompatibility complex I</i> ; MHC I) | Mhashilkar <i>et al.</i> , 2002 |
| Basigin / CD147 (<i>cluster of differentiation 147</i>) | Tragoolpua <i>et al.</i> , 2008 |
| Toll-ähnlicher Rezeptor 2 (<i>toll-like receptor 2</i> ; TLR2) | Kirschning <i>et al.</i> , 2010 |
| Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (<i>vascular cell adhesion molecule I</i> ; VCAM-1) | Strebe <i>et al.</i> , 2009 |
| Alpha V Integrin | Koistinen <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Proteine aus der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen</i> | |
| Beta-Amyloid Vorläuferprotein (<i>beta-amyloid precursor protein</i> ; APP) | Paganetti <i>et al.</i> , 2005 |
| Beta-Amyloid Protein (A-beta) | Sudol <i>et al.</i> , 2009 |
| Zelluläres Prionprotein (<i>cellular prion protein</i> ; PrP ^C) | Cardinale <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Weitere Proteine</i> | |
| Apolipoprotein B (apoB) | Liao <i>et al.</i> , 2008 |
| p75 Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR) | Zhang <i>et al.</i> , 2012 |

1.4 Zielsetzung

Für das Studium der Polysialylierung des NCAM bieten sich diverse Verfahren an. Durch ST8SiaII^{-/-}/ST8SiaIV^{-/-}-Mäuse konnte die Bedeutung der Polysialylierung für die Embryonalentwicklung gezeigt werden und dass sich der Verlust beider Polysialyltransferasen in der postnatalen Phase als letal erweist (Weinhold *et al.*, 2005). Der Verlust von jeweils einer Polysialyltransferase gab durch unterschiedliche Phänotypen Aufschluss über eine differenzierte Aufgabenverteilung, doch wird hierbei der Ausfall der einen Polysialyltransferase durch die jeweils noch existierende in einem gewissen Maß kompensiert (Eckhardt *et al.*, 2000; Angata *et al.*, 2004). Polysialinsäure kann außerdem durch Endosialidasen für einen kurzen Zeitraum enzymatisch entfernt werden. Neben der Anwendung *in vitro* ist dies zwar auch *in vivo* möglich, doch findet diese Methode ihre Limitierung in der begrenzten Erreichbarkeit der Zellen durch das Enzym (Daniel *et al.*, 2001). Eine weitere Möglichkeit für Untersuchungen der Polysialylierung *in vitro* stellt die Inhibition der Polysialyltransferasen durch den Einsatz von synthetischen Vorläufermolekülen der Polysialinsäure dar (Horstkorte *et al.*, 2004). Als letzte Methode wurde auch die Anwendung von siRNA (*small interfering RNA*) beschrieben, wodurch die Expression der Polysialyltransferasen reduziert werden konnte (Schreiber *et al.*, 2008). Die Nützlichkeit von siRNA für Untersuchungen *in vitro* oder *in vivo* hängt dabei aber von der variierenden Effektivität des *knockdowns* und dem möglichen Auftreten von unspezifischen Nebeneffekten ab. Das Ziel dieser Arbeit ist daher, basierend auf dem spezifischen *knockdown* durch ER-Intrabodies, eine effizientere Methode zur Reduzierung der Expression des polysialylierten NCAM zu entwickeln. Durch die Intrabodies sollen die Polysialyltransferasen im ER zurückgehalten werden, sodass sie nicht mehr in der Lage sind, das NCAM im Golgi-Apparat zu polysialylieren.

Die Konstruktion der ER-Intrabodies beginnt mit der Isolierung von RNA aus Hybridomazellen, die monoklonale Antikörper gegen die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV produzieren. Nach Amplifikation der DNA der variablen Domänen sowie ihrem Zusammenbau zu scFv-DNA wird diese in den Expressionsvektor pCMV/*myc*/ER kloniert und als ER-Intrabody exprimiert. Es folgt die Funktionsanalyse *in vitro*, bei der überprüft werden soll, ob die Intrabodies ihre Antigene binden und so die Polysialylierung des NCAM verhindern können. Die

Bindung zwischen den Intrabodies und den Polysialyltransferasen wird dabei durch Ko-Immunpräzipitation sowie mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) gezeigt. Die Kolo-kalisation von Antigen und Intrabody und damit die Retention der Polysialyltransferasen im ER wird in mikroskopischen Immunfluoreszenz-Aufnahmen demonstriert, wozu stabile CHO-Zelllinien verwendet werden, die jeweils nur eine der Polysialyltransferasen exprimieren. Mittels dieser Zelllinien folgt schließlich auch die Darstellung der reduzierten Oberflächenexpression des polysialylierten NCAM per Durchflusszytometrie und im Immunblot. Als letztes werden die Intrabodies *in vivo* in einem Mausexperiment angewendet, um den Effekt auf die Metastasierung analog zu den Arbeiten von Daniel *et al.* (2001) zu überprüfen. Zu diesem Zweck wird eine beide Polysialyltransferasen exprimierende TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinie mit den Expressionsplasmiden beider Intrabodies sowie einer Luziferase stabil transfiziert. Zusätzlich wird zum Vergleich eine Zelllinie mit einem bereits existierenden und funktionalen Intrabody gegen das NCAM generiert. Die Zellen werden anschließend in Mäuse injiziert, um das Tumorwachstum sowie die Metastasierung durch Messung der Luminiszenz der Zellen mittels *in vivo imaging system* (IVIS) zu verfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Antikörper

| Herkunft | Bezeichnung | Konzentration |
|-----------------------------|--|---------------|
| Abcam | Maus anti-Calnexin AF18 | 1 mg/ml |
| Dianova | Ziege anti-Kaninchen Cy3 | 0,75 mg/ml |
| Dianova | Ziege anti-Maus Cy3 | 0,75 mg/ml |
| Dianova | Ziege anti-Maus RPE | 0,75 mg/ml |
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | Maus anti-polySia 735 | 2 mg/ml |
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | Ratte anti-NCAM H28 | 3,5 mg/ml |
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | Maus anti-HA 12CA5 | 1 mg/ml |
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | Kaninchen anti- α -Mannosidase II | - |
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | Maus anti-ST8SiaII | 3,1 mg/ml |
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | Maus anti-ST8SiaIV | 9,9 mg/ml |
| Jackson ImmunoResearch | Ziege anti-Kaninchen FITC | 1,5 mg/ml |
| Jackson ImmunoResearch | Ziege anti-Maus TRITC | 1,5 mg/ml |
| Jackson ImmunoResearch | Ziege anti-Maus HRP | 1,5 mg/ml |
| Novus Biologicals | Ziege anti-c-myc FITC | - |
| Santa Cruz Biotechnology | Maus anti-c-myc 9E10 | 0,2 mg/ml |
| Santa Cruz Biotechnology | Maus anti-NCAM ERIC-1 | 0,2 mg/ml |
| Santa Cruz Biotechnology | Ziege anti-Ratte HRP | 0,1 mg/ml |
| Santa Cruz Biotechnology | Ziege anti-Ratte RPE | 0,4 mg/ml |
| Sigma-Aldrich | Maus anti-FLAG M5 | 4,4 mg/ml |

2.1.2 Enzyme und Proteine

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Enzyme und Proteine

| Herkunft | Bezeichnung | Konzentration |
|-----------------------------|------------------------------------|---------------|
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | Endosialidase Endo-NF #1588 | 2,54 mg/ml |
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | ST8SiaII | 0,9 mg/ml |
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | ST8SiaIV (1192) | 2 mg/ml |
| Dr. Martina Mühlenhoff, MHH | NCAM Ig3-FNII | 1,7 mg/ml |
| Invitrogen | Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase | 5 U/ μ l |

| | | |
|---------------------|-------------------|----------|
| New England Biolabs | <i>AatII</i> | 10 U/μl |
| New England Biolabs | <i>SalI</i> | 10 U/μl |
| New England Biolabs | <i>NotI</i> | 10 U/μl |
| New England Biolabs | <i>XbaI</i> | 10 U/μl |
| Promega | Ribonuklease H | 1,5 U/μl |
| Promega | DNA Polymerase I | 7 U/μl |
| Promega | T4 DNA Polymerase | 9,7 U/μl |
| Promega | T4 DNA Ligase | 3 U/μl |

2.1.3 Geräte

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Geräte

| Hersteller und Bezeichnung | Funktion |
|--|---------------------------|
| BD FACSCalibur | Durchflusszytometer |
| Berthold Technologies Lumat LB 9507 | Luminometer |
| Biometra Ti 1 | Transilluminator |
| BioRad Gene Pulser | Elektroporator |
| BioRad Transblot Semi-dry Transfer Cell | Blot-Gerät |
| Heraeus Biofuge pico | Mikrozentrifuge |
| Heraeus Multifuge 1 S-R; Megafuge 1.0R; Du Pont / Sorvall RC5C | Zentrifuge |
| Intas High-Res CCD-Kamera | Geldokumentation |
| MJ Research Peltier Thermal Cycler 200 | PCR-Gerät |
| Perkin Elmer IVIS 200 | IVIS |
| Perkin Elmer Ultraview Vox Confocal Imaging System | Konfokales Lasermikroskop |
| Amersham Pharmacia Ultraspec 3100 pro; Labsystems Multiscan Ex 405 | Photometer |
| Thermo Scientific HERAccl 150i CO ₂ Incubator | Zellkulturinkubator |
| Zeiss Axiovert S100 | Fluoreszenzmikroskop |

2.1.4 Kits

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits

| Hersteller | Bezeichnung | Verwendungszweck |
|------------|---|-----------------------------------|
| Amersham | First-Strand cDNA Synthesis Kit | cDNA-Synthese |
| Genomed | JETSORB Gel Extraction Kit | Elution von DNA aus Agarose-Gelen |
| Genomed | JETSTAR2.0 Plasmid Maxiprep Kit | Plasmid-Präparation |
| Genomed | JETSTAR2.0 Plasmid Miniprep Kit | Plasmid-Präparation |
| Genomed | JETquick DNA Clean Up Spin Kit | Säulenchromatographie |
| Invitrogen | TA Cloning Kit | Ligation |
| Stratagene | QuikChange II-E Site-Directed Mutagenesis Kit | Ortsspezifische Mutagenese |

2.1.5 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|------------------------------------|---|
| Blotpuffer | 48 mM Tris, 39 mM Glycerin, in H ₂ O |
| DMEM | DME-Pulvermedium, 37,5 g NaHCO ₃ , 100 ml 1 M HEPES, auf 10 l H ₂ O (pH 7,0-7,4) |
| DMEM (Zellkulturmedium) | 10 % FCS, 1 % 0,2 M Glutamin, 1 % 100-fach Penicillin/Streptomycin, in DMEM |
| DNA-Ladepuffer (10-fach) | 50 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylenxlenol, in H ₂ O |
| Elektrophoresepuffer | 50 mM Tris, 380 mM Glycerin, 0,1 % SDS, in H ₂ O |
| HEBS (2-fach) | 300 mM NaCl, 40 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,4 mM Na ₂ HPO ₄ , in H ₂ O (pH 7,1) |
| LB-Medium | 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 13 g/l Agar, in H ₂ O |
| Lysepuffer | 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM MgCl ₂ , 1 % NP-40, in H ₂ O |
| MOPS-Puffer (10-fach) | 0,4 M 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (pH 7), 100 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA (pH 8), in H ₂ O (pH 7) |
| PBS | 8 g/l NaCl, 0,22 g/l KCl, 1,43 g/l Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , in H ₂ O (pH 7,0) |
| PBST | 0,05 % Tween 20 in PBS |
| Penicillin/Streptomycin (100-fach) | 6,06 g/l Ampicillin, 10 g/l Streptomycin, in H ₂ O (pH 7,2) |
| RNA-Ladepuffer (5-fach) | 80 µl 0,5 M EDTA, 720 µl 37 % Formaldehyd, 4 ml 10-fach MOPS-Puffer, 2 ml Glycerin, 3 ml Formamid, 50 µl 50 mg/ml Ethidiumbromid, 0,25 % Bromphenolblau, auf 10 ml H ₂ O |
| SDS-Ladepuffer (5-fach) | 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 200 mM DTT/ β -Mercaptoethanol, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, in H ₂ O |
| SDS-PAGE Sammelgel | 675 µl Acrylamid (40 % (w/v) 29:1 Acrylamid: Bisacrylamid), 1,75 ml Tris Sammelgel, 4,27 ml H ₂ O, 35 µl 10 % APS, 7 µl TEMED |
| SDS-PAGE Trenngel (10 %) | 5,06 ml Acrylamid (40 % (w/v) 29:1 Acrylamid: Bisacrylamid), 5,63 ml Tris Trenngel, 9,38 ml H ₂ O, 150 µl 10 % APS, 15 µl TEMED |
| SDS-PAGE Trenngel (7 %) | 3,54 ml Acrylamid (40 % (w/v) 29:1 Acrylamid: Bisacrylamid), 5,63 ml Tris Trenngel, 10,9 ml H ₂ O, 150 µl 10 % APS, 15 µl TEMED |
| SDS-PAGE Tris Sammelgel | 30,5 g Tris, auf 400 ml H ₂ O (pH 6,7), 20 ml 10 % SDS, auf 500 ml H ₂ O |
| SDS-PAGE Tris Trenngel | 91 g Tris, auf 400 ml H ₂ O (pH 8,8), 20 ml 10 % SDS, auf 500 ml H ₂ O |
| SOB-Medium | 2 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 0,05 g NaCl, 250 µg KCl, 20 µl NaOH, 0,5 ml 1 M MgCl ₂ , auf 100 ml H ₂ O |
| TAE-Puffer | 40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, in H ₂ O |

2.1.6 Molekulargewichtsmarker

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Molekulargewichtsmarker

| Hersteller und Bezeichnung | Funktion und Größenspektrum |
|---|--|
| Fermentas GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus | DNA-Molekulargewichtsmarker 100-3000 bp |
| Fermentas GeneRuler 1kb DNA Ladder | DNA-Molekulargewichtsmarker 250-10000 bp |
| BioRad Precision Plus Protein All Blue Standards | Protein-Molekulargewichtsmarker 10-250 kDa |
| BioRad Precision Plus Protein Dual Color Standard | Protein-Molekulargewichtsmarker 10-250 kDa |

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide (Eurofins MWG Operon)

| Bezeichnung | Sequenz 5'-3' |
|---------------------|--|
| OG-strand | gATCgTggTACCgAATTCgCggCCgTCgACg |
| GO-strand | CgTCgACgCggCCgCgAATTCggTACC |
| Linkerprimer2 | gATCgTggTACCgAATTCgCg |
| C-Heavy-IgG1 | CTggACAgggATCCAgAgTTC |
| C-Kappa2 | ggAAgATggATACAgTTggTgCag |
| VHBACK-SALI-STX3167 | CAACTgCAggTCgACCAggTCCAAGTgCagCagCCTggg |
| VLFOR-NOTI-STX3167 | TTTgATgCggCCgCCCgTTTgATTTCCAgCTTggTgCC |
| VHFOR-STX3167 | TgAggAgACTgTgAgAgTggTgCCTTg |
| VLBACK-STX3167 | gATgTTgTggTgACTCAAAGTCCACTC |
| LINKER-STX3167 | ggCACCAGTCTCACAgTCTCCTCAGgTggAggCggTTCAGgCggAggTg gCTCTggCgg TggCggATCggATgTTgTggTgACTCAAAGTCCA |
| LINKFOR-STX3167 | TggAgTTTgAgTCACCACAACATCCgA |
| LINKBACK-STX3167 | ggCACCAGTCTCACAgTCTCCTCAGgT |
| VHBACK-SALI-PST3175 | CAACTgCAggTCgACgAggTTCAGCTgCagCagTCTggg |
| VLFOR-NOTI-PST3175 | TTTgATgCggCCgCCCgTTTTATTTCCAgCTTggTCCC |
| VHFOR-PST3175 | TgAggAgACggTgACTgAggTTCCTTg |
| VLBACK-PST3175 | AACATTATgATgACACAgTCgCCATCA |
| LINKER-PST3175 | ggAACCTCAGTCACCgTCTCCTCAGgTggAggCggTTCAGgCggAggTgg CTCTggCgg TggCggATCgAACATTATgATgACACAgTCgCCA |
| LINKFOR-PST3175 | TggCgACTgTgTCATCATAATgTTCgA |
| LINKBACK-PST3175 | ggAACCTCAGTCACCgTCTCCTCAGgT |
| M13-forward(-20) | gTAAAACgACggCCAg |
| M13-reverse | CAGgAAACAgCTATgAC |
| VER-TOL-FOR | ggCACgggggAggggCAAACAACA |
| VER-TOL-BACK | CCACTTTgCCTTTCTCTCCACAgg |

| | |
|--------------|--|
| MYCtoHA-BACK | CgggCggCCgCATACCCATACgACgTCCCAgACTACgCTAATggAgCTgCAAgCgAgAAg |
| MYCtoHA-FOR | CTTCTCgCTTgCAGCTCCATTAgCgTAgTCTgggACgTCgTATgggTATgCggCCgCCCg |

2.1.8 Plasmide und Vektoren

Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Plasmide und Vektoren

| Bezeichnung und Herkunft | Beschreibung |
|--|--|
| pCR2.1 (Invitrogen) | Klonierungsvektor aus dem Invitrogen TA cloning Kit |
| pCMV/myc/ER (Invitrogen) | Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter, ER-Signalpeptid, myc-Epitop, ER-Retentionssignal und Neomycin-Resistenz |
| pCMV/myc/ER- α TLR9-Intrabody (Dr. Thomas Böldicke, HZI) | Eukaryotischer Expressionsvektor für anti-TLR9 Intrabody mit CMV-Promoter, myc-Tag und Neomycin-Resistenz |
| pcDNA3-FLAG-HA (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH) | Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter und FLAG- und HA-Epitop |
| pcDNA3-FLAG-HA-ST8SiaII (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH) | Eukaryotischer Expressionsvektor für ST8SiaII mit CMV-Promoter und FLAG/HA-Tag |
| pcDNA3-FLAG-HA-ST8SiaIV (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH) | Eukaryotischer Expressionsvektor für ST8SiaIV mit CMV-Promoter und FLAG/HA-Tag |
| pSV40/Zeo/A7 (Dr. Thomas Böldicke, HZI) | Eukaryotischer Expressionsvektor für anti-VEGFR-2 Intrabody (Klon A7) mit SV40-Promoter, myc-Tag und Zeocin-Resistenz |
| pVBC3luc2puro (Dr. Andrea Kröger, HZI) | Eukaryotischer Expressionsvektor für Luziferase (<i>firefly</i>) mit Puromycin-Resistenz |
| pCMV/myc/ER- α NCAM-Intrabody (Dr. Thomas Böldicke, HZI) | Eukaryotischer Expressionsvektor für anti-NCAM Intrabody mit CMV-Promoter, myc-Tag und Neomycin-Resistenz |

2.1.9 Programme

Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten Programme

| Hersteller und Bezeichnung | Verwendungszweck |
|----------------------------|--|
| BD CellQuestPro | Steuerung und Auswertung der Analysen am Durchflusszytometer |
| Corel DRAW Graphics Suite | Grafikbearbeitung |
| InforMax Vector NTI | Grafische Analyse und Erstellung von DNA-Sequenzen/Vektoren |
| Intas Gel Capture | Aufnahme von Agarose-Gelen |
| Microsoft Office | Textverarbeitung, Erstellung von Grafiken und Graphen |

| | |
|---------------------------|---|
| Perkin Elmer Living Image | Steuerung und Auswertung der Analysen am IVIS |
| Perkin Elmer Volocity | Aufnahmen am konfokalen Lasermikroskop |
| Qimaging Qcapture Pro | Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop |
| Technelysium Chromas Lite | Erstellung von Textdateien nach DNA-Sequenzierung |

2.1.10 Reagenzien

Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Reagenzien

| Hersteller | Bezeichnung | Verwendung |
|--------------------------|---|---------------------------------|
| Baxter | Isofluran | Mausbetäubung |
| BioRad | Magermilchpulver | Immunblot, ELISA |
| Invitrogen | Lipofectamine 2000 | Transfektion |
| Invivogen | Neomycin (Geneticin) | Selektion stabile Zelllinien |
| Invivogen | Zeocin | Selektion stabile Zelllinien |
| Invivogen | Puromycin | Selektion stabile Zelllinien |
| PAA Laboratories | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Zellkulturmedium/Transfektion |
| PAN Biotech | Fetal calf serum (FCS) | Zellkulturmedium |
| PJK | Beetle-Juice Luciferin buffer | Luziferinlösung <i>in vitro</i> |
| Promega | Reporter Lysis Buffer | Lysepuffer Luziferaseaktivität |
| Santa Cruz Biotechnology | Protein G PLUS Agarose | Immunpräzipitation |
| Serva | Dimethylsulfoxid (DMSO) | Einfrieren von Zellen |
| Sigma-Aldrich | DME-Pulvermedium | Zellkulturmedium |
| Sigma-Aldrich | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) | ELISA |
| Sigma-Aldrich | Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Tetrahydrochlorid / Metal Enhancer | Immunblot |
| Sigma-Aldrich | TRI Reagent LS | RNA-Isolierung |
| Synchem | D-Luciferin potassium salt | Luziferinlösung <i>in vivo</i> |
| Vector Laboratories | Vectashield Mounting Medium | Immunfluoreszenz |

2.1.11 Zelllinien

Tabelle 2.11: Auflistung der verwendeten Zelllinien

| Bezeichnung und Herkunft | Beschreibung |
|--|---|
| HEK293 (DSMZ) | Humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney</i>) |
| DH5 α - <i>E.coli</i> (Invitrogen) | DH5 α -Stamm von <i>Escherichia coli</i> , kompetent für Elektroporation |

| | |
|--|---|
| TE671 (DSMZ) | Zellen des Rhabdomyosarkoms |
| CHO-C6 (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH) | Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (<i>chinese hamster ovary</i>) |
| CHO-2A10+500 (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH) | Stabile CHO-2A10-Zellen mit Expression von ST8SiaII |
| CHO-2A10+418 (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH) | Stabile CHO-2A10-Zellen mit Expression von ST8SiaIV |
| Hybridomazellen (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH) | ST8SiaII und -IV Antikörper-produzierende B-Zellen fusioniert mit Myelomazellen |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hybridomazellen

Die entsprechenden Hybridomazellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und geerntet (2.3.2). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurden nur Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet, die mit 0,2 % DEPC-Lösung autoklaviert wurden, um eine Kontamination mit Ribonukleasen auszuschließen. Nach Zentrifugation für 5 min und 10000 rpm in einer Mikrozentrifuge wurde der Überstand erneut entfernt und die Zellen in 1 ml *TRI Reagent LS* aufgenommen. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, der Ansatz per Hand für 15 s geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde die obere, farblose und wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 1 ml *TRI Reagent LS* versetzt. Die einzelnen Schritte wurden wiederholt bis zur erneuten Überführung der wässrigen Phase. Nun wurden 0,5 ml Isopropanol hinzugefügt, der Ansatz per Hand vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand entfernt und das RNA-Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, gefolgt von 5 min Zentrifugation bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit. Zuletzt wurde der Überstand entfernt, das Pellet für 10 min bei RT getrocknet und schließlich in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Der Ansatz wurde weiter verwendet oder bei -70 °C eingefroren.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA/DNA

Die Konzentration von wässrigen RNA- und DNA-Lösungen wurde in einer Quarzküvette über die optische Dichte bei 260 nm am Photometer bestimmt.

2.2.3 RNA/DNA Agarose-Gelelektrophorese

RNA:

Der Laufpuffer bestand aus 6,6 % Formaldehyd in MOPS-Puffer, ergänzt um 1 % Agarose für die Herstellung des Gels. Die RNA wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen für 10 min bei 55 °C inkubiert, mit 5-fach RNA-Ladepuffer mit Ethidiumbromid versetzt und in die Geltaschen gegeben. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht.

DNA:

Der Laufpuffer bestand aus TAE-Puffer, ergänzt um 1 % Agarose und 1 µl Ethidiumbromid (50 mg/ml) pro 100 ml Puffer für die Herstellung des Gels. Die DNA wurde mit 10-fach DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem geeigneten Größenstandard in die Geltaschen gegeben. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht.

2.2.4 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA (2.2.1) erfolgte nach Anleitung des *First-Strand cDNA Synthesis Kit*. Verwendet wurden 7 µg Gesamt-RNA in 20 µl H₂O, 11 µl *bulk first-strand cDNA mix* und 1:10 verdünnter pd(N)₆-Primer. Zuletzt wurde der Ansatz bei -20 °C eingefroren oder weiter verwendet.

2.2.5 Generierung doppelsträngiger cDNA mit glatten Enden

Für die Generierung doppelsträngiger cDNA wurden 20 µl aus der cDNA-Synthese (2.2.4) mit 10 µl 10-fach DNA Polymerase I Puffer, 1,8 µl 5 M KCl-Lösung, 46 U DNA Polymerase I und 1,6 U Ribonuklease H vermischt und der Ansatz auf 100 µl mit H₂O aufgefüllt. Nach 2 h Inkubation bei 14 °C wurden die Enzyme bei 70 °C für 10 min inaktiviert. Um glatte Enden zu erhalten, wurde anschließend 8 U T4 DNA Polymerase

hinzugegeben, der Ansatz für 10 min 37 °C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl 0,2 M EDTA-Lösung gestoppt. Zuletzt wurde die DNA aufgereinigt (2.2.6) und bei -20 °C eingefroren oder weiter verwendet.

2.2.6 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA erfolgte per Säulenchromatographie nach Anleitung des *JETquick DNA Clean Up Spin Kit*. Am Ende wurde die DNA in 30 µl 65 °C warmem H₂O aufgenommen.

2.2.7 Ligation einer Adaptersequenz an doppelsträngige cDNA

Die beiden Oligonukleotidstränge GO-strand und OG-strand wurden zur Herstellung des Adapter-DNA-Fragments in äquimolarem Verhältnis gemischt und für 30 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf RT abgekühlt. 10 pmol Adapter-DNA wurden mit 2,5 U T4 DNA Ligase, 3 µl 10-fach T4 DNA Ligase Puffer und 250 ng doppelsträngiger cDNA (2.2.5) gemischt und auf 30 µl mit H₂O aufgefüllt, gefolgt von einer Inkubation bei 15 °C ü.N. Am Ende wurde die DNA aufgereinigt (2.2.6) und bei -20 °C eingefroren oder weiter verwendet

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) wurde verwendet, um die DNA der variablen Domänen der Antikörper aus der cDNA mit Adapter-Sequenz, die DNA der variablen Domänen mit spezifischen Primern und die Linker-DNA zu amplifizieren. Für alle Ansätze wurde dasselbe PCR-Programm verwendet (Tab. 2.12). Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes blieb ebenso gleich und unterschied sich nur durch die verwendeten Primer und die jeweils eingesetzte DNA als *template* (Tab. 2.13). Die amplifizierte DNA wurde bei -20 °C eingefroren oder in einer Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3) weiter verwendet.

Tabelle 2.12: Programm für die Polymerase-Kettenreaktion

| PCR-Programm | |
|---------------|-------------|
| 5 min 94 °C | } 30 Zyklen |
| 0,5 min 94 °C | |
| 0,5 min 62 °C | |
| 1 min 72 °C | |
| 7 min 72 °C | |

Tabelle 2.13: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

| Komponente | Volumen | Endkonzentration |
|---------------------------|----------------------|------------------|
| 10-fach PCR-Puffer | 2,5 µl | 1-fach |
| 10 mM dNTP-Mix | 0,5 µl | 0,2 mM |
| 50 mM MgCl ₂ | 0,75 µl | 1,5 mM |
| 10 µM Primer A | 0,5 µl | 0,2 µM |
| 10 µM Primer B | 0,5 µl | 0,2 µM |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase | 0,1 µl | 1 U |
| Template-DNA | x µl | 50 ng |
| H ₂ O | Auf 25 µl Endvolumen | - |

2.2.9 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Die entsprechende DNA-Bande wurde aus dem Agarose-Gel unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA nach Anleitung des *JETSORB Gel Extraction Kit* eluiert. Am Ende wurde die DNA in 20 µl H₂O aufgenommen und bei -20 °C eingefroren oder weiter verwendet.

2.2.10 TA-Klonierung

Die Klonierung von durch *Taq* DNA Polymerase amplifizierter DNA (2.2.8) in den Vektor pCR2.1 wurde nach Anleitung des *TA Cloning Kit* durchgeführt. Der Erfolg der Ligationsreaktion wurde per Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.2.3).

2.2.11 Transformation per Elektroporation

50 µl Aliquots kompetenter DH5 α -*E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,5-2 µl DNA-Lösung versetzt und für 1 min auf Eis inkubiert. Der Elektroporator wurde auf 25 µF Aufnahmefähigkeit, 2,5 kV/cm Feldspannung und 200 Ω Widerstand eingestellt. Die Zellen wurden nun in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette gegeben und in die Kammer geschoben. Der folgende elektrische Puls ergab bei erfolgreicher Transformation eine Zeitkonstante von 4 bis 5 ms. Anschließend wurde sofort 1 ml

SOB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zuletzt wurden verschiedene Volumina (10-100 µl) auf LB-Agarplatten ausplattiert und die Platten bei 37 °C für einen Tag inkubiert. Zur Selektion transformierter Zellen wurde LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin und im Fall des pCR2.1-Vektors (2.2.10) sowie für die ortsspezifische Mutagenese (2.2.19) zusätzlich die Blau-Weiß-Selektion (2.2.12) verwendet.

2.2.12 Blau-Weiß-Selektion

Für die Selektion von transformierten Zellen (2.2.11) mit pCR2.1-Vektor (2.2.10) oder nach der ortsspezifischen Mutagenese (2.2.19) wurden LB-Agarplatten vor der Ausplattierung der Transformationsansätze mit je 40 µl X-Gal- (40 mg/ml) und 0,1 M IPTG-Lösung bestrichen.

2.2.13 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion

Die Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Identifikation positiver Klone nach Transformation und Selektion auf LB-Agarplatten verwendet (2.2.11 und 2.2.12). Dafür wurden die Zellen einer Bakterienkolonie in 20 µl Wasser gegeben und 10 min bei 95 °C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Die Reaktionskomponenten und das PCR-Programm entsprachen dabei denen der PCR (2.2.8).

2.2.14 Plasmid-Präparation

Je nach Bedarf an DNA-Ausbeute wurden Mini- und Maxi-Präparationen durchgeführt. Die Durchführung richtete sich nach Anleitung des *JETSTAR2.0 Plasmid Miniprep/Maxiprep Kit*. Für die Plasmid-Mini-Präparationen wurden 4 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin ü.N. bei 37 °C und 180 rpm kultiviert, für die Plasmid-Maxi-Präparationen wurden 100 ml Medium verwendet. Am Ende wurde die DNA in 30 bzw. 500 µl Wasser aufgenommen und bei -20 °C eingefroren.

2.2.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Abteilung für Genomanalyse am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung durchgeführt. Dazu wurden die DNA-Lösungen auf 500 ng/μl und die entsprechenden Primer auf 10 pmol/μl eingestellt.

2.2.16 Assembly-Polymerase-Kettenreaktion

Die *assembly*-PCR wurde verwendet, um die DNA der variablen Domänen der Antikörper und der *linker*-Sequenz zu scFv-DNA zusammenzufügen. Die PCR wurde dabei in zwei Schritte unterteilt, um die DNA erst zu komplettieren und dann zu amplifizieren (Tab. 2.14): Im ersten Schritt wurden jeweils 100 ng der drei verschiedenen DNA-Komponenten in einem Ansatz vereinigt, um die PCR-Komponenten (2.2.8) abzüglich Primer ergänzt und auf 25 μl mit H₂O aufgefüllt. Im zweiten Schritt wurden dann noch einmal 25 μl mit allen PCR-Komponenten inklusive Primer (je 1 μl bzw. 0,4 μM für 50 μl Reaktionsansatz) hinzugefügt.

Tabelle 2.14: *assembly*-PCR-Programme

| 1. PCR | 2. PCR |
|---------------|-------------|
| 5 min 94 °C | 2 min 94 °C |
| 1,5 min 94 °C | 1 min 94 °C |
| 3 min 65 °C | 2 min 60 °C |
| } 10 Zyklen | 2 min 72 °C |
| | 7 min 72 °C |
| | } 30 Zyklen |

2.2.17 Restriktionsverdau mit Endonukleasen

Die in der *assembly*-PCR (2.2.16) komplettierte scFv-DNA wurde aus dem Vektor pCR2.1 in den Vektor pCMV/*myc*/ER umklontiert. Dazu wurden beide per Restriktionsverdau mit den Enzymen *Not*I und *Sal*I geschnitten. 5 μg pCR2.1-Vektor mit der scFv-DNA und 2,5 μg pCMV/*myc*/ER-Vektor wurden mit jeweils 5 μl NEB3-Puffer (10-fach), 0,5 μl BSA (100 μg/ml), 0,5 μl *Sal*I (10 U/μl), 0,5 μl *Not*I (10 U/μl) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 50 μl bei 37 °C für 16 h inkubiert, gefolgt von 20 min bei 65 °C zur Inaktivierung der Enzyme.

Zur Umklonierung der DNA-Sequenz des anti-ST8SiaII Intrabody in den Vektor des anti-VEGFR-2 Intrabody (pSV40/Zeo/A7) wurden beide Vektoren einem Restriktions-

verdau mit den Enzymen *SalI* und *XbaI* unterzogen. Analog zum Restriktionsverdau mit *SalI* und *NotI* wurden 5 µg pCMV/*myc*/ER-ST8SiaII und 2,5 pSV40/Zeo/A7 mit jeweils 5 µl NEB3-Puffer (10-fach), 0,5 µl BSA (100 µg/ml), 0,5 µl *SalI* (10 U/µl), 0,5 µl *XbaI* (10 U/µl) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei 37 °C für 16 h inkubiert, gefolgt von 20 min bei 65 °C zur Inaktivierung der Enzyme.

Nach der ortsspezifischen Mutagenese (2.2.19) wurde eine Testspaltung mit *AatII* durchgeführt. 2 µg Plasmid-DNA wurden mit 5 µl NEB4-Puffer (10-fach), 0,5 µl *AatII* (10 U/µl) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei 37 °C für 16 h inkubiert, gefolgt von 20 min bei 65 °C zur Inaktivierung der Enzyme.

Zuletzt wurde der jeweilige Restriktionsverdau bei -20 °C eingefroren oder in einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht (2.2.3) und je nach Bedarf die entsprechende DNA aus dem Gel eluiert (2.2.9).

2.2.18 Ligation

Die Ligation wurde eingesetzt für die Ligation der Adaptersequenz (2.2.7), im Rahmen der TA-Klonierung (2.2.10) von PCR-Produkten in den Vektor pCR2.1 sowie für die Umklonierung der scFv-DNA aus dem pCR2.1-Vektor in den pCMV/*myc*/ER-Vektor und der DNA des anti-ST8SiaII Intrabody in den Vektor pSV40/Zeo/A7 (2.2.17). Die Durchführung richtete sich, abgesehen von der Ligation der Adaptersequenz, jeweils nach der Anleitung des *TA Cloning Kit* sowie der T4 DNA Ligase. Für die Umklonierungen wurden jeweils 100 ng Vektor-DNA mit 47 ng für die DNA der scFv-Fragmente und 52 ng für die DNA des anti-ST8SiaII Intrabody verwendet. Die Ligation erfolgte mit 0,3 µl T4 DNA Ligase (3 U/µl), 1 µl 10-fach T4 Ligasepuffer und H₂O in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 14 °C ü.N., gefolgt von 10 min bei 70 °C zur Inaktivierung der Ligase. Der Erfolg der Ligation wurde jeweils in einer Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3) überprüft und der entsprechende Ansatz bei -20 °C eingefroren oder für eine Transformation weiter verwendet (2.2.11).

2.2.19 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wurde nach Umklonierung des anti-ST8SiaII Intrabody in den Vektor pSV40/Zeo/A7 eingesetzt (2.2.18 und 2.2.19), um die Sequenz des *myc*-Tags durch die Sequenz eines HA-Tags zu ersetzen. Die Durchführung richtete sich

nach der Anleitung des *QuikChange II-E Site-Directed Mutagenesis Kit*. Verwendet wurden die Primer MYCtoHA-BACK und MYCtoHA-FOR. Aus der Größe des Vektors ergab sich für den letzten Schritt des PCR-Zyklus (68 °C) eine Zeit von 6 min. Der Erfolg der Mutagenese wurde über einen Restriktionsverdau mit *AatII* bestimmt (2.2.17), da die Sequenz des HA-Tags eine entsprechende Schnittstelle beinhaltet.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellen wurden bei -70 °C für 30 min angetaut. Anschließend wurden sie bei RT und schließlich im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml Zellkulturmedium vermischt. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5 min pelletiert und der DMSO-haltige Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in einer 25 cm² Zellkulturflasche oder in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät.

Zum Einfrieren wurden Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen kultiviert, geerntet (2.3.2) und in 1,5 ml FCS mit 10 % DMSO aufgenommen. Anschließend wurde der Ansatz in Kryoröhrchen überführt und bei -70 °C eingefroren. Für die Langzeitlagerung wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

2.3.2 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden in DMEM-Zellkulturmedium kultiviert, welches mit 10 % FCS und jeweils 1 % 0,2 M Glutamin- und 1 % 100-fach Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt war. Die Kultivierung im Brutschrank erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂, 98 % relative Feuchte und 0,2 % O₂. Die Zellen wurden jeweils vor Erreichen der Konfluenz umgesetzt. Für die Zellernte wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, PBS hinzugegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers oder per Pipette abgelöst und mittels Pipettieren vereinzelt. Eine Ablösung der Zellen durch Trypsinierung wurde vermieden, um den enzymatischen Verdau der Zelladhäsionsmoleküle und damit des NCAM zu vermeiden. Es folgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min.

Anschließend wurde neues Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellen erneut ausgesät.

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde nach Rosenthal-Fuchs für adhärent wachsende Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium mit einem Zellkultur-schaber oder per Pipette abgelöst und durch Pipettieren vereinzelt. Ein Aliquot wurde dann mit Trypanblau verdünnt und in die Rosenthal-Fuchs-Zählkammer gegeben. Anschließend wurde im Lichtmikroskop die Anzahl der ungefärbten lebenden Zellen in den Großquadraten der Zählkammer gezählt und der Durchschnitt berechnet. Die Berechnung der Zellzahl pro ml Zellkulturmedium war wie folgt:

$$\text{Zellzahl/ml} = 5 \times 10^3 \times \text{Verdünnung mit Trypanblau} \times \text{Zellen/Großquadrat} \times 1 \text{ ml}$$

2.3.4 Transfektion von Plasmid-DNA

Kalziumphosphat:

Die Transfektion mit Kalziumphosphat wurde nur für die Expressionskontrolle der Intrabodies verwendet. Dazu wurden HEK293-Zellen auf 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und kultiviert. Waren die Zellen zu 60-80 % konfluent gewachsen, wurde 4 h vor der Transfektion das Zellkulturmedium abgesaugt und mit 9/10 (2,25 ml) neuem Medium ersetzt. 1/10 des Volumens (0,25 ml) wurde für den Transfektionsansatz benötigt. Die Hälfte dieses Volumens (125 µl) bestand aus 2-fach HEBS, die andere aus 1/10 (12,5 µl) 2,5 M Kalziumchloridlösung und 9/10 (112,5 µl) der DNA-Lösung, die wiederum 5 µg DNA beinhaltete. Die DNA-Lösung wurde dann mit dem Kalziumchlorid gemischt und auf die HEBS-Lösung unter Schütteln aufgetropft. Anschließend wurde der Transfektionsansatz für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde er gleichmäßig auf das Zellkulturmedium aufgetropft. 12 h nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben.

Lipofectamine 2000:

Die Durchführung und DNA-Menge für Transfektionen mit *Lipofectamine 2000* richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers und wurde zwischen den verschiedenen Zelllinien nicht variiert. Als Zellkulturmedium für die Zeitdauer der Transfektion wurde DMEM-Zellkulturmedium ohne Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) sowie zusätzlich ohne FCS für den Transfektionsansatz verwendet.

2.3.5 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Zur Fixierung von Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS inkubiert. Dann wurde die Lösung entfernt und die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS wiederum für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz dreimal mit 3 % BSA in PBS gewaschen sowie einmal mit PBS. Die Zellen wurden dann für die Immunfluoreszenz weiter verwendet (2.4.1) oder zur Lagerung mit PBS bedeckt und bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.6 Zellyse

Die Zellen wurden geerntet (2.3.2) und das Zellpellet mit eiskaltem Lysepuffer versetzt. Nach mehrmaligem Pipettieren wurde der Ansatz für 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Zuletzt wurde der Ansatz für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden direkt weiter verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

2.3.7 Bestimmung der Antibiotika-Toxizität

Um zu ermitteln, welche Konzentration an Antibiotikum im Zellkulturmedium für die Generierung stabiler TE671- und CHO-C6-Zelllinien (2.3.8) geeignet ist, wurden die Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Pro Ansatz wurden die Zellen dann einer anderen Konzentration an Antibiotikum ausgesetzt. Die endgültige Konzentration wurde etwas höher als die für den Zelltod nicht transfizierter Zellen nötige

Konzentration festgelegt, um eine höhere Widerstandskraft transfizierter Zellen zu berücksichtigen (Tab. 2.15).

Tabelle 2.15: Antibiotika-Konzentration für die Generierung stabiler Zelllinien

| Antibiotikum | Getestete Konzentrationen (µg/ml) * geringste Konzentration ohne Zellwachstum | Ermittelte Konzentration |
|----------------------|---|--------------------------|
| Neomycin (Geneticin) | 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800*, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 | 1000 µg/ml |
| Zeocin | 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400*, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 | 500 µg/ml |
| Puromycin | 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8*, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 10 | 1 µg/ml |

2.3.8 Generierung stabiler Zelllinien

Für die Generierung stabiler Zelllinien wurden die Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden und *Lipofectamine 2000* transfiziert (2.3.4). Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet (2.3.2) und auf 96-Loch-Zellkulturplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum im Zellkulturmedium (2.3.7) ausgesät. In den Ansätzen, die in der Folge ein Wachstum aufwiesen, wurden die Zellen dann wieder geerntet und nach Bestimmung der Zellzahl (2.3.3) in einer Verdünnung ausplattiert, die statistisch eine Einzelzelle pro Ansatz bedeutete (Vereinzelung). Nach erneutem Wachstum wurde die Vereinzelung wiederholt. Am Ende wurden gewachsene Klone dann auf Expression des selektierten Gens untersucht mittels Immunfluoreszenz (2.4.1), Immunblot (2.4.5) oder Bestimmung der Luziferaseaktivität (2.4.7).

2.3.9 Proliferationsassay

Jeweils 5×10^4 Zellen der stabilen Zelllinien (2.3.8) wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, um ihr Wachstum miteinander zu vergleichen. Über acht Tage wurde jeden Tag die Zellzahl bestimmt (2.3.3), sodass pro Zelllinie acht Ansätze verwendet wurden.

2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.4.1 Immunfluoreszenz

Die fixierten und permeabilisierten Zellen (2.3.5) wurden für 2 h mit dem primären Antikörper in 3 % BSA in PBST inkubiert (Tab. 2.16). Danach wurden sie fünfmal mit PBST gewaschen und anschließend für 1 h unter Lichtausschluss mit dem sekundären Antikörper in 3 % BSA in PBST inkubiert (Tab. 2.16). Zuletzt wurden die Zellen viermal mit PBST und einmal mit PBS gewaschen und mit PBS zur Analyse und für die kurzfristige Aufbewahrung bedeckt. Für die Analyse am konfokalen Lasermikroskop war ein flaches Präparat notwendig, sodass die Kultivierung und Färbung der Zellen in 8-Loch-Kammerobjektträgern erfolgte. In diesem Fall wurde nach den Antikörperinkubationen jegliche Flüssigkeit entfernt, die Kammer abgenommen und der Objektträger mit *Vectashield Mounting Medium* benetzt. Ein Deckplättchen wurde aufgelegt und mit Nagellack versiegelt.

Tabelle 2.16: In der Immunfluoreszenz eingesetzte Antikörper in Abhängigkeit des Zielproteins

| Zielprotein (Tag) | Primärer Antikörper (Verdünnung) | Sekundärer Antikörper (Verdünnung) |
|--|--|---|
| anti-ST8SialII / IV Intrabody (myc) | Maus anti-myc 9E10 (1:200) Ziege anti-myc FITC-konjugiert (1:400) | Ziege anti-Maus TRITC-konjugiert Ziege anti-Maus Cy3-konjugiert (1:200) - - |
| anti-ST8SialII Intrabody (HA) | Maus anti-HA 12CA5 (1:500) | Ziege anti-Maus Cy3-konjugiert (1:200) |
| ST8SialII / IV (FLAG-HA) | Maus anti-FLAG M5 (1:500) | Ziege anti-Maus Cy3-konjugiert Ziege anti-Maus FITC-konjugiert (1:200) |
| NCAM | Maus anti-NCAM ERIC-1 (1:200) | Ziege anti-Maus Cy3-konjugiert (1:200) |
| Calnexin | Maus anti-Calnexin AF18 (1:500) | Ziege anti-Maus Cy3-konjugiert (1:200) |
| α -Mannosidase II | Kaninchen anti- α -Mannosidase II (1:500) | Ziege anti-Kaninchen Cy3-konjugiert (1:200) |

2.4.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für die Analyse mittels ELISA wurden jeweils 50 ng der aufgereinigten und löslichen Polysialyltransferasen-Proteine in 50 μ l 0,2 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,5) auf 96-Loch-Platten gegeben und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit

entfernt, die Ansätze mit PBST gewaschen und mit jeweils 100 µl 5 % Magermilchpulver in PBS für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBST wurde der primäre Antikörper in 50 µl PBS in definierten Konzentrationen hinzugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde für 1 h bei RT der sekundäre und Peroxidase-konjugierte Antikörper in 50 µl PBS eingesetzt. Wiederum nach fünf Waschvorgängen wurden schließlich jeweils 50 µl TMB auf die Ansätze gegeben, bis ein Farbunterschied erkennbar wurde. 50 µl 1 M H₂SO₄ stoppte die Reaktion, und die Absorption der einzelnen Ansätze wurde bei 450 nm im Photometer gemessen.

Als primäre Antikörper wurden die originalen Maus anti-ST8SiaII und -IV in einer Verdünnungsreihe eingesetzt, beginnend mit 500 ng und dann jeweils halbiert Menge. Die Detektion durch den sekundären Antikörper erfolgte mit Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper (1:1000). Für den Test der Intrabodies wurden HEK293-Zellen in einer 25 cm² Zellkulturflasche mit den Expressionsplasmiden transfiziert, kultiviert, geerntet und schließlich in 100 µl Lysepuffer lysiert (2.3.4, 2.3.2 und 2.3.6). Das Zelllysate wurde auf den ersten Ansatz gegeben und dann jeweils in PBS um die Hälfte verdünnt. In diesem Fall erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt mit Maus anti-myc 9E10 Antikörper (1:500). Ein weiterer Inkubationsschritt ergab sich auch für die Überprüfung der Bindungsfähigkeit des anti-ST8SiaIV Antikörpers, wenn NCAM an die Polysialyltransferase gebunden vorliegt. In diesem Fall wurden jeweils 100 ng aufgereinigtes und lösliches NCAM-Protein auf den 96-Loch-Platten fixiert und eine Inkubation mit 50 ng der Polysialyltransferase ST8SiaIV der Detektion mit dem primären Antikörper vorgeschaltet.

2.4.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitationen wurden Zellen auf 6-Loch-Zellkulturplatten mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert (2.3.4) und bei Erreichen der Konfluenz geerntet (2.3.2). Im Fall der Überprüfung der Expressionsdauer der Intrabodies wurde die Zellernte nach festen Zeitpunkten durchgeführt. Die Zelllyse erfolgte mit 100 µl Lysepuffer (2.3.6), wozu dann 900 µl PBS gegeben wurden. Zusammen mit 2 µg des präzipitierenden Antikörpers wurde der Ansatz für 1 h bei 4 °C und regelmäßigem Invertieren des Reaktionsgefäßes inkubiert. Danach wurden 20 µl *Protein G PLUS Agarose* hinzugegeben und der Ansatz ü.N. bei 4 °C auf einem Rollergerät weiter

inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Agarose bei 3000 rpm und 4 °C in einer Mikrozentrifuge pelletiert, der Überstand entfernt und 1 ml PBS zum Waschen hinzugefügt. Das Waschen wurde insgesamt viermal durchgeführt und die Flüssigkeit anschließend entfernt. Am Ende wurde das Agarose-Pellet in 8 µl 5-fach SDS-Ladepuffer und 32 µl Wasser aufgenommen. Der Ansatz wurde bei -20 °C eingefroren oder für eine SDS-PAGE (2.4.4) weiter verwendet.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für eine diskontinuierliche SDS-PAGE wurden ein Trenngel und ein Sammelgel gegossen. Für hochmolekulare Proteine wie NCAM und polysialyliertes NCAM wurde ein Trenngel mit 7 % Acrylamidanteil verwendet, für die Intrabodies und die Polysialyltransferasen ein Gel mit 10 %. Das polymerisierte Gel wurde dann in eine vertikale Elektrophoresekammer gestellt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die einzelnen Zelllysate-Proben (2.3.6) wurden vor Beladen des Gels mit 5-fach SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Wenn im folgenden Immunblot (2.4.5) Polysialinsäure detektiert werden sollte, wurden die Proben bei nur 65 °C für 10 min inkubiert, um eine Zersetzung der Polysialinsäure zu vermeiden. Für einen Kontrollansatz wurde in diesem Fall vor dem Erwärmen der Proben 0,5 µl Endosialidase hinzugefügt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Pro Ansatz wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl in der SDS-PAGE verwendet und 5 µl eines Molekulargewichtsmarkers sowie H₂O mit 5-fach SDS-Ladepuffer für leere Geltaschen wurden pro Gel hinzugefügt. Die Elektrophorese lief bei 120 V, bis sich alle Banden des Markers im Trenngel befanden und der Ladepuffer das Gel verlassen hatte.

2.4.5 Immunblot

Es wurde ein halb-trockener Blot (*semi-dry blot*) durchgeführt. Dazu wurden eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) und zwei *Whatman*-Filterpapiere in Gelgröße ausgeschnitten. Die Membran wurde kurz in Methanol getaucht und schließlich in Blotpuffer auf eines der Filterpapiere gelegt. Darauf wurde dann zuerst das Gel aus der SDS-PAGE (2.4.4) und danach das zweite Filterpapier gelegt. Nach 5 min wurde diese Anordnung mit der Membran auf Seite der Anode in das mit Blotpuffer befeuchtete Blot-Gerät gegeben. Der Blot-Vorgang wurde für 1,5 h bei 170 mA, bzw. für die

Intrabodies für 30 min bei 15 V, durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 30 min mit 5 % Magermilchpulver in PBS auf einem Wippschüttler abgesättigt. Danach wurde der primäre Antikörper in 2 % Magermilchpulver in PBS hinzugegeben und die Membran ü.N. bei 4 °C auf einem Wippschüttler inkubiert (Tab. 2.17). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS gewaschen, gefolgt von der zweiten Antikörperinkubation für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper in 2 % Magermilchpulver in PBS (Tab. 2.17). Danach wurde die Membran dreimal mit PBS gewaschen und schließlich mit Wasser abgespült. In 10 ml Wasser wurden je eine Tablette *Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Tetrahydrochlorid* und *Sigma Fast Metal Enhancer* gelöst. Unter ständigem Schwenken wurde die Membran in der Lösung inkubiert, bis eventuell auftretende Proteinbanden zu sehen waren und das Produkt der DAB-Umsetzung durch die Peroxidase ausfiel. Zuletzt wurde die Membran noch einmal mit Wasser abgespült und getrocknet.

Tabelle 2.17: Im Immunblot eingesetzte Antikörper in Abhängigkeit des Zielproteins

| Zielprotein (Tag) | Primärer Antikörper (Verdünnung) | Sekundärer Antikörper (Verdünnung) |
|------------------------------------|---|---|
| anti-ST8SiaII / IV Intrabody (myc) | Maus anti-myc 9E10 (1:500) | Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiert (1:2000) |
| anti-ST8SiaII Intrabody (HA) | Maus anti-HA 12CA5 (1:100) | Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiert (1:2000) |
| ST8SiaII / IV (FLAG-HA) | Maus anti-FLAG M5 (1:100) | Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiert (1:2000) |
| NCAM (human) | Maus anti-NCAM ERIC-1 (1:500) | Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiert (1:2000) |
| NCAM (Hamster) | Ratte anti-NCAM H28 (1:100) | Ziege anti-Ratte Peroxidase-konjugiert (1:2000) |
| Polysialinsäure | Maus anti-polySia 735 (1:100) | Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiert (1:2000) |

2.4.6 Durchflusszytometrie

Die zu analysierenden Zellen wurden in 48-Loch-Platten bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach Ernte der Zellen (2.3.2) wurden sie in 300 µl 2 % FCS in PBS aufgenommen und auf 96-Loch-Rundbodenplatten zu je 100 µl aufgeteilt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 1500 rpm wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 100 µl 2 % FCS in PBS zusammen mit dem primären Antikörper (1:200) vermischt. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurde erneut zentrifugiert und die Zellen zweimal mit 2 % FCS in PBS gewaschen, jeweils gefolgt von einer weiteren Zentrifugation. Anschließend wurde die zweite Inkubation mit dem sekundären

Antikörper (1:200) durchgeführt. Wiederum nach 30 min Inkubation bei 4 °C und zweimaligen Waschen wurden die Zellen in 300 µl 2 % FCS in PBS und 1:1000 verdünnter Propidiumjodidlösung (1 mg/ml) aufgenommen. Das Propidiumjodid diente zur Markierung von toten Zellen bei der anschließenden Messung am Durchflussszytometer. Im Fall der Messung von Polysialinsäure wurde als Kontrolle eine Endosialidase eingesetzt (0,5 µl in 100 µl PBS), indem ein Inkubationsschritt vor dem ersten Antikörper eingefügt wurde.

2.4.7 Messung der Luziferaseaktivität

Die verschiedenen selektierten Klone der stabilen Zelllinien (2.3.8) mit dem Expressionsplasmid einer Luziferase wurden in 48-Loch-Platten bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. 5-fach *Reporter Lysis Buffer* (RLB) wurde mit H₂O verdünnt und auf Raumtemperatur gebracht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 65 µl Lysepuffer, gefolgt von einmaligem Einfrieren und Auftauen der Zellen (*freeze-thaw cycle*). Die Zellen wurden dann geerntet, 15 s per Vortexer geschüttelt und anschließend 15 s bei RT und maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt. Von jeder Probe wurden jeweils 10 µl mit 100 µl *Beetle-Juice*-Luziferinlösung vermischt und am Luminometer gemessen (Messzeit: 10 s).

2.5 *In vivo* Experimente

2.5.1 Maushaltung

Verwendet wurden zum Startzeitpunkt der Experimente zwanzig Wochen alte C57BL/6J RAG-2 Mäuse (Dr. Andrea Kröger, HZI). Die Mäuse wurden vom Tierpflege-Service des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung betreut und bekamen als Nahrung *diet Ssniff V1534-3 R/M-H* sowie angesäuertes Wasser (pH 3). Es befanden sich jeweils fünf bzw. sechs Tiere zusammen in einem Käfig, welche einmal pro Woche in neue Käfige transferiert wurden. Die Euthanasie am Ende der

Experimente erfolgte durch zervikale Dislokation während der Betäubung durch 2-3 % Isofluran in der Atemluft.

2.5.2 Zellinjektion

Für die Injektionen der stabilen Zelllinien in die Mäuse wurden jeweils 10^6 kultivierte Zellen geerntet (2.3.2), einmal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS aufgenommen. Die Mäuse wurden mit 2-3 % Isofluran in der Atemluft betäubt und die in PBS (RT) gelösten Zellen intraperitoneal mit einer Kanüle injiziert.

2.5.3 *In vivo imaging system (IVIS)*

Für die Messung der Luminiszenz am IVIS wurden die Mäuse mit 2-3 % Isofluran in der Atemluft betäubt und ventral mit einem Langhaarschneider rasiert, damit die Signalgebung nicht durch das dunkle Fell beeinflusst wurde. Anschließend wurden 100 μ l einer Luziferinlösung (D-Luziferin in PBS, steril filtriert, 33 mg/ml, RT) intraperitoneal injiziert. Nach 10 min zur Verteilung des Luziferins wurden die Mäuse unter weiterer Betäubung mit Isofluran im IVIS analysiert. Zur Messung wurde jeweils eine Bilderserie unter Standardeinstellungen, aber mit unterschiedlichen Belichtungszeiten, angelegt (0,01 s, 0,05 s, 0,1 s, 0,25 s, 0,5 s, 1 s, 2 s, 5 s, 10 s). Die Messungen begannen eine Woche nach Injektion der Zellen und wurden jede Woche bis zur Woche 6 wiederholt. Aufgrund des fortschreitenden Tumorwachstums wurden die Versuche dann beendet und die Mäuse euthanasiert.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung von Intrabodies gegen die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV

Von zwei monoklonalen Antikörpern gegen die Polysialyltransferase ST8SiaII und sieben monoklonalen Antikörpern gegen ST8SiaIV werden jeweils zwei für die Herstellung von ER-Intrabodies ausgewählt (Klon 3167 und 3190 für anti-ST8SiaII sowie 3175 und 3194 für anti-ST8SiaIV). Die Antikörper wurden im Vorfeld der Arbeit generiert, indem Balb/c Mäuse mit den entsprechenden Polysialyltransferasen immunisiert, die B-Zellen isoliert und mit der Zelllinie Ag8.653 zu Hybridomazellen fusioniert wurden (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH). Im Folgenden werden nur die Ergebnisse der später auch angewendeten Antikörper anti-ST8SiaII 3167 und anti-ST8SiaIV 3175 dargestellt.

Die Herstellung von Intrabodies ausgehend von Antikörper-produzierenden Hybridomazellen erfolgt durch eine Kombination von mehreren Methoden (Böldicke *et al.*, 2012) (Abb. 3.1): Zuerst wird die Gesamt-RNA der Hybridomazellen isoliert und mit Zufallsprimern komplett in cDNA transkribiert. Aus dem RNA/DNA-Heteroduplex wird dann doppelsträngige cDNA mit glatten Enden (*blunt-ends*) generiert, um die Ligation eines Adapter-DNA-Fragments zu ermöglichen (3.1.1). Mit einem Primer für die bekannte Adaptersequenz und Primern für die konservierten konstanten Domänen der Antikörperketten werden die variablen Domänen aus dem cDNA-Mix amplifiziert und ihre Sequenz bestimmt. Durch Vergleiche mit bekannten Sequenzen von variablen Domänen anderer Antikörper können so spezifische Primer für die 5'- und 3'-Enden der variablen Domänen sowie für ein synthetisches (Gly₄Ser)₃-*linker*-DNA-Fragment generiert werden, womit deren Amplifikation ermöglicht wird (3.1.2). Die DNA der variablen Domänen und der *linker*-Sequenz wird dann in einer *assembly*-PCR zu einem scFv-DNA-Fragment kombiniert und in den Expressionsvektor pCMV/*myc*/ER kloniert (siehe Anhang, Abb. 6.2). Dieser fügt eine ER-Signalsequenz am 5'-Ende sowie eine ER-Retentionssequenz und ein *myc*-Tag zur Detektion am 3'-Ende der scFv-Sequenz an, sodass das scFv bei Expression als Intrabody fungieren kann (3.1.3).

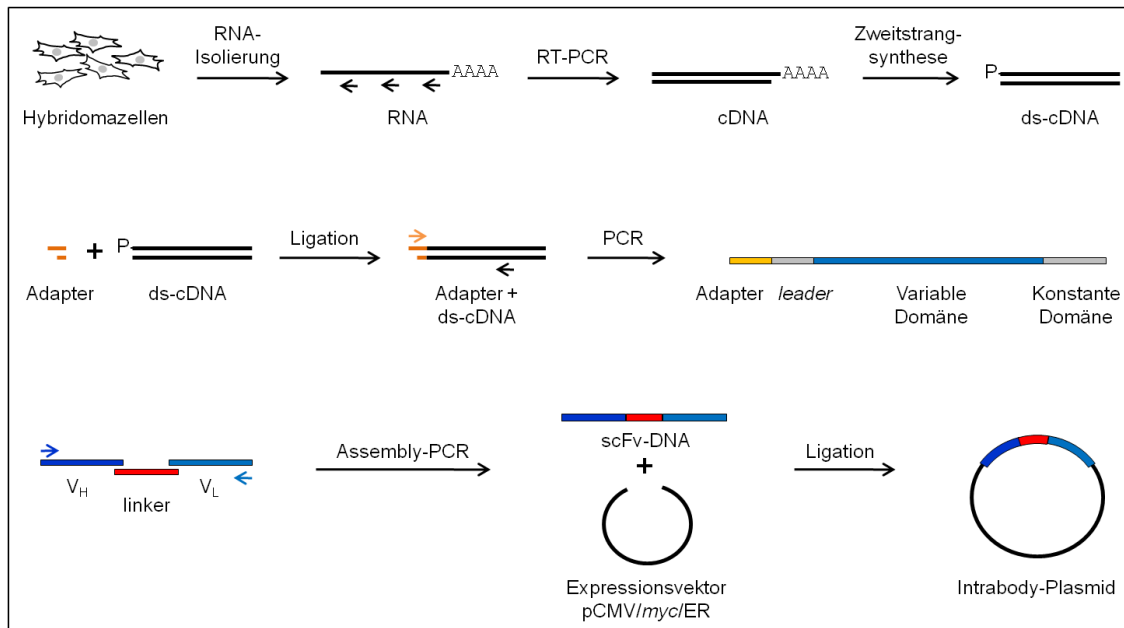


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Herstellung von Intrabodies aus Antikörper-produzierenden Hybridomazellen. Aus Hybridomazellen wird RNA isoliert und mittels Reverse Transkriptase cDNA generiert. Diese wird in doppelsträngige cDNA mit glatten Enden umgewandelt und per Ligation einseitig über den aus der Zweitstrangsynthese erhaltenen Phosphatrest mit einem Adapter-Molekül versehen. Primer für das Adaptermolekül und die konstanten Domänen der Ketten des Antikörpers liefern die Sequenzinformation für die variablen Domänen. Dadurch können diese amplifiziert und mit Schnittstellen versehen sowie ein *linker*-Fragment generiert werden. In einer *assembly*-PCR ergibt sich aus diesen drei Bausteinen das scFv-DNA-Fragment, welches dann in den Expressionsvektor pCMV/myc/ER kloniert wird. cDNA: *complementary* DNA. ds: doppelsträngig. P: Phosphatrest. PCR: *polymerase chain reaction*. RT-PCR: Reverse Transkriptase PCR. scFv: *single chain Fragment variable*. (modifiziert nach Böldicke *et al.*, 2012)

3.1.1 RNA-Isolierung aus anti-ST8SiaII- und anti-ST8SiaIV-produzierenden Hybridomazellen und Generierung doppelsträngiger cDNA mit einer Adaptersequenz

Die jeweiligen Hybridomazellen werden kultiviert und zur Isolierung von Gesamt-RNA verwendet. Anschließend wird ihre Konzentration bestimmt und durch eine RNA-Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 3.2). Dabei zeigen sich im Agarose-Gel bei ca. 5 kb und 2 kb die eukaryotische RNA auszeichnenden Banden der ribosomalen 28S und 18S RNA (5,1 kb und 1,9 kb) in einem für intakte RNA charakteristischen 2:1 Mengenverhältnis.

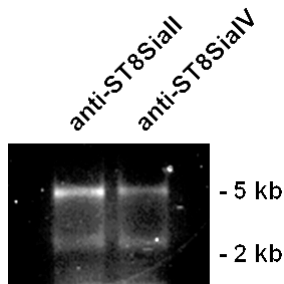


Abbildung 3.2: Agarose-Gel der isolierten Gesamt-RNA aus Hybridomazellen. Die isolierte Gesamt-RNA aus anti-ST8SiaII- und anti-ST8SiaIV-produzierenden Hybridomazellen ist in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. kb: Kilobasenpaare.

Die Gesamt-RNA wird vollständig mit Hilfe von pd(N)_6 -Zufallsprimern in cDNA umgeschrieben und aus denen auf diese Weise erhaltenen RNA/DNA-Heteroduplex-Fragmenten doppelsträngige cDNA mit glatten Enden generiert. Anschließend wird ein Adapter-Molekül, bestehend aus den Oligonukleotiden OG-strand und GO-strand, einseitig an die doppelsträngige cDNA ligiert, um in der nachfolgenden PCR als eine der Primer-Bindungsstellen zu fungieren.

3.1.2 Amplifikation der DNA der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten der Antikörper anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV sowie einer *linker*-Sequenz

Beide Maus-Antikörper weisen den Isotyp IgG1 und eine leichte Kette des Typs kappa auf, sodass für die bekannten Sequenzen der konservierten konstanten Domänen der schweren Kette (C_H1) und der leichten Kette (C_L) Primer generiert werden können (C-heavy-IgG1, C-kappa2). Zusammen mit einem Primer für die Adapter-Sequenz (Linkerprimer2) werden die entsprechenden Sequenzen inklusive der variablen Domänen (V_H und V_L) aus dem cDNA-Mix (3.1.1) mit einer *Taq* DNA Polymerase amplifiziert und in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Um nach Sequenzierung durch die PCR verursachte Mutationen ausschließen zu können, werden jeweils drei Ansätze parallel durchgeführt (Abb. 3.3). Dabei zeigen sich im Vergleich zum 100 bp Molekularmarker (M) die erwarteten Größen von ca. 600 bp für die amplifizierte DNA der schweren Ketten und ca. 450 bp für die leichten Ketten der Antikörper.

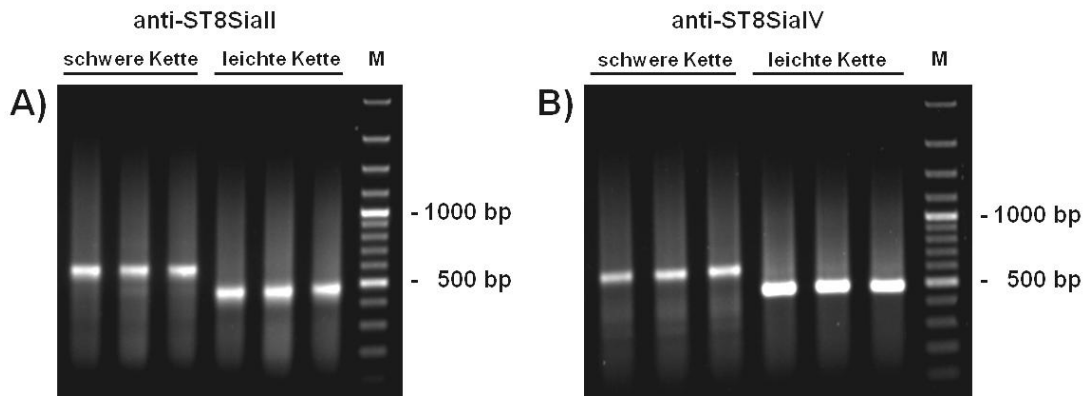


Abbildung 3.3: Präparative Agarose-Gele der PCR mit Primern für die konstanten Domänen und das Adapter-Fragment der doppelsträngigen cDNA. Die PCR-Ansätze sind in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt und die DNA durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. A) PCR-Ansätze für die schwere Kette des anti-ST8SialII Antikörpers mit den Primern C-heavy-IgG1 und Linkerprimer2 und für die leichte Kette mit den Primern C-kappa2 und Linkerprimer2. B) PCR-Ansätze für die schwere Kette des anti-ST8SialIV Antikörpers mit den Primern C-heavy-IgG1 und Linkerprimer2 und für die leichte Kette mit den Primern C-kappa2 und Linkerprimer2. bp: Basenpaare. M: 100 bp Molekularmarker.

Die entsprechenden Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und mittels TA-Klonierung in einen pCR2.1-Vektor (siehe Anhang, Abb. 6.1) ligiert. Nach Transformation der Plasmide in elektrokompente *E.coli*-Zellen werden positive Klone über eine Blau-Weiß-Selektion isoliert und durch eine Kolonie-PCR überprüft, in der unter Verwendung derselben Primer wie zur vorherigen Amplifikation die Anwesenheit der klonierten Sequenzen in den Plasmiden der verschiedenen Klone verifiziert wird. Nach Kultivierung der Klone und einer anschließenden Plasmid-Präparation werden die Plasmide mit den Primern M13 reverse und M13 forward (-20) sequenziert.

Anhand der gewonnenen Sequenzen werden durch Vergleiche mit bekannten Sequenzen von variablen Domänen die 5'- und 3'-Enden von V_H und V_L bestimmt und entsprechende Primer synthetisiert (VHFOR-STX3167, VLBACK-STX3167, VHFOR-PST3175, VLBACK-PST3175). Für das 5'-Ende der DNA von V_H soll dabei eine *SalI*-Restriktionsschnittstelle (VHBACK-SALI-STX3167, VHBACK-SALI-PST3175) und für das 3'-Ende der DNA von V_L eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle (VLFOR-NOTI-STX3167, VLFOR-NOTI-PST3175) für die spätere Klonierung in den Expressionsvektor pCMV/*myc*/ER durch die Primer hinzugefügt werden. Darüber hinaus wird eine DNA-Sequenz für einen synthetischen *linker* im (Gly₄Ser)₃-Format generiert, die überlappende und damit komplementäre Enden zum 3'-Ende von V_H und 5'-Ende von

V_L enthält (LINKER-STX3167, LINKER-PST3175). Um die *linker*-Sequenz amplifizieren zu können, werden auch dafür passende Primer generiert (LINKBACK-STX3167, LINKFOR-STX3167, LINKBACK-PST3175, LINKFOR-PST3175) (Abb. 3.4).

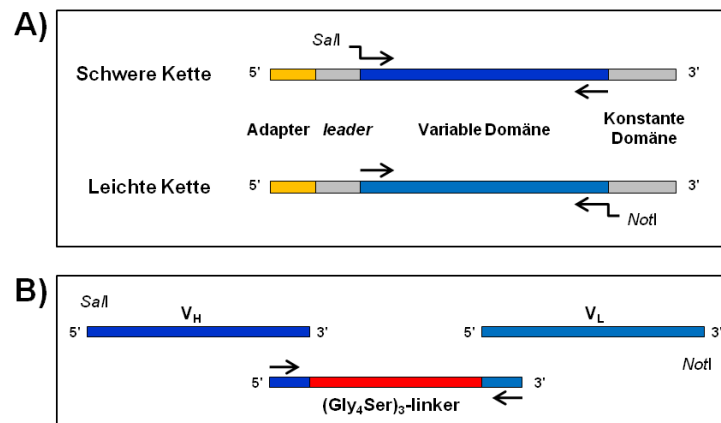


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Herstellung von Primern für die Amplifikation der DNA der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten der Antikörper sowie des *linker*-Fragments. A) Die durch einen Primer für das Adapter-Fragment sowie für die konstante Domäne gewonnenen DNA-Sequenzen werden mit bekannten Antikörpersequenzen verglichen, um Anfang (5') und Ende (3') der DNA der variablen Domänen zu bestimmen und für die Synthese entsprechender Primer zu verwenden. Im Fall der schweren Kette wird der Primer für das 5'-Ende um eine *SaII*-Restriktionsschnittstelle ergänzt, bei der leichten Kette für das 3'-Ende um eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle. B) Das (Gly₄Ser)₃-*linker*-DNA-Fragment besteht aus drei Wiederholungen eines Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Motivs (45 Nukleotide) und wird um je 24 Nukleotide komplementär zum 3'-Ende von V_H sowie zum 5'-Ende von V_L ergänzt. Entsprechende Primer ermöglichen die Amplifikation des Fragments. Gly: Glycin. Ser: Serin. V_H: Variable Domäne der schweren Kette. V_L: Variable Domäne der leichten Kette. (modifiziert nach Böldicke *et al.*, 2012)

In einer zweiten Amplifikationsrunde werden die spezifischen Primer für die DNA der variablen Domänen sowie für die *linker*-Sequenz eingesetzt (Abb. 3.5). Dabei zeigen sich im Agarose-Gel im Vergleich zum 100 bp Molekularmarker (M) die berechneten Größen von 351 bp für die V_H des anti-ST8SiaII Antikörpers, 353 bp für die V_L sowie 363 bp und 353 bp entsprechend für den anti-ST8SiaIV Antikörper. Für die *linker*-Sequenzen ergibt sich eine Größe von jeweils 93 bp. Die entsprechenden Banden werden anschließend wieder aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und in pCR2.1-Vektoren ligiert. Nach Transformation, Selektion und Präparation werden die Plasmide mit der DNA der variablen Domänen ein weiteres Mal sequenziert.

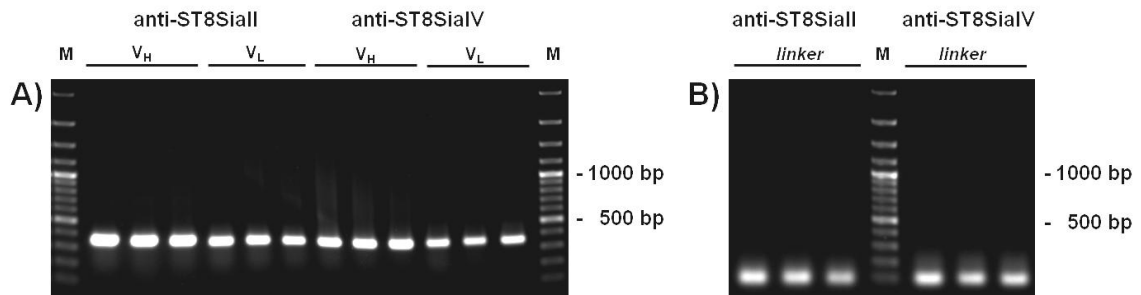


Abbildung 3.5: Präparative Agarose-Gele der PCR mit spezifischen Primern für die DNA der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten der Antikörper sowie des *linker*-Fragments. Die PCR-Ansätze sind in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt und die DNA durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. A) PCR-Ansätze für die V_H des anti-ST8SiaII Antikörpers mit den Primern VHFOR-STX3167 und VHBAC-SALI-STX3167 und dessen V_L mit den Primern VLBACK-STX3167 und VLFOR-NOTI-STX3167 sowie für die V_H des anti-ST8SiaIV Antikörpers mit den Primern VHFOR-PST3175 und VHBAC-SALI-PST3175 und dessen V_L mit den Primern VLBACK-PST3175 und VLFOR-NOTI-PST3175. B) PCR-Ansätze für die *linker*-Sequenz des anti-ST8SiaII Antikörpers mit den Primern LINKBACK-STX3167 und LINKFOR-STX3167 sowie des anti-ST8SiaIV Antikörpers mit den Primern LINKBACK-PST3175 und LINKFOR-PST3175. bp: Basenpaare. M: 100 bp Molekularmarker. V_H: Variable Domäne der schweren Kette. V_L: Variable Domäne der leichten Kette.

3.1.3 Synthese der anti-ST8SiaII- und anti-ST8SiaIV-scFv-DNA-Fragmente und Klonierung in den Expressionsvektor pCMV/*myc*/ER

Um die amplifizierte DNA der variablen Domänen der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Antikörper und des synthetischen *linker* (3.1.2) in einer *assembly-PCR* zu einer scFv-Sequenz zusammenzufügen, wird in einer ersten PCR nur die entsprechende DNA ohne Primer eingesetzt. Durch die überlappenden Sequenzen des *linker*-Fragments mit dem 3'-Ende von V_H und dem 5'-Ende von V_L soll dies zur Komplettierung der scFv-Sequenz führen. In einer zweiten PCR wird die scFv-Sequenz dann durch Zugabe der bereits für die Amplifikation der variablen Domänen verwendeten Primer VHBAC-SALI-STX3167, VHBAC-SALI-PST3175, VLFOR-NOTI-STX3167 und VLFOR-NOTI-PST3175 amplifiziert (Abb. 3.6). Im Vergleich zum 100 bp Molekularmarker (M) zeigt sich nach einer Agarose-Gelelektrophorese eine Bande für die scFv-DNA des anti-ST8SiaII Antikörpers in der berechneten Größe von 749 bp sowie von 761 bp für anti-ST8SiaIV. Schwächere Banden aus dem ersten PCR-Schritt treten in den Größen der DNA der *linker*-Sequenz, der variablen Domänen und der variablen Domänen verbunden mit der *linker*-Sequenz auf. Die der scFv-DNA

entsprechenden Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und per TA-Klonierung in den pCR2.1-Vektor ligiert. Nach Transformation, Selektion und Präparation werden die Plasmide sequenziert, um die korrekte scFv-Sequenz zu verifizieren.

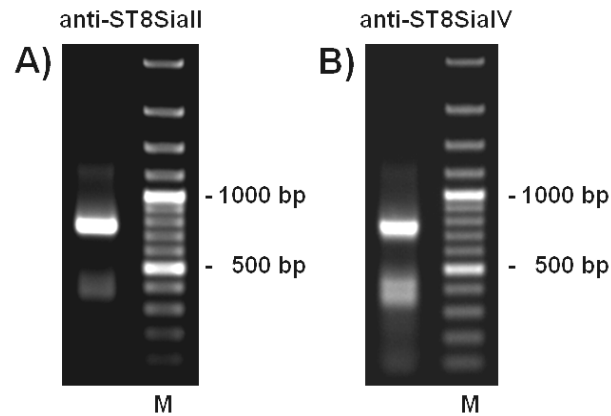


Abbildung 3.6: Präparative Agarose-Gele der *assembly-PCR* der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV scFv-DNA. Die PCR-Ansätze sind in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt und die DNA durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. A) PCR-Ansatz mit der DNA der variablen Domänen und der *linker*-Sequenz des anti-ST8SiaII Antikörpers mit den Primern VHBACK-SALI-STX3167 und VLFOR-NOTI-STX3167. B) PCR-Ansatz mit der DNA der variablen Domänen und der *linker*-Sequenz des anti-ST8SiaIV Antikörpers mit den Primern VHBACK-SALI-STX3175 und VLFOR-NOTI-STX3175. bp: Basenpaare. M: 100 bp Molekularmarker.

Die im pCR2.1-Vektor vorliegenden scFv-DNA-Sequenzen werden in einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *SalI* und *NotI* geschnitten, ebenso wie der Expressionsvektor pCMV/*myc*/ER. Nach einer Agarose-Gelelektrophorese werden die geschnittene Vektor- sowie die scFv-DNA aus dem Gel eluiert und beide Fragmente in einer Ligationsreaktion miteinander verbunden. Nach Transformation in *E.coli* werden positive Klone dann nur noch über eine Kolonie-PCR mit den in der *assembly-PCR* verwendeten Primern identifiziert, da der Vektor pCMV/*myc*/ER keine Blau-Weiß-Selektion erlaubt. Zur weiteren Überprüfung werden die Plasmide präpariert und einer Testspaltung mit *SalI* und *NotI* unterzogen. Anschließend folgt eine letzte Sequenzierung mit den Primern VER-TOL-FOR und VER-TOL-BACK, um die Anwesenheit der korrekten Sequenzen im pCMV/*myc*/ER-Vektor zu verifizieren. Nun liegen die kompletten Intrabody-Sequenzen für anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV bestehend aus ER-Signalsequenz, scFv-Sequenz, *myc*-Epitop und ER-Retentionssignal vor (siehe Anhang, Abb. 6.3 und 6.4).

3.1.4 Expression der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV

Zur Überprüfung der Expression der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV werden HEK293-Zellen mittels Kalziumphosphat mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transient transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion werden die Zellen für eine Immunfärbung verwendet, bei der die Intrabodies über das myc-Tag detektiert werden. Als Positivkontrolle dient dabei das Expressionsplasmid eines anti-TLR9 Intrabody, als Negativkontrolle der leere Vektor pCMV/*myc*/ER. (Abb. 3.7). Dabei zeigt sich für beide Intrabodies eine Färbung analog zur Positivkontrolle. Weiterhin zeigt das Signal ein für ER-Proteine charakteristisches Expressionsmuster, bei dem der Nukleus ausgespart ist.

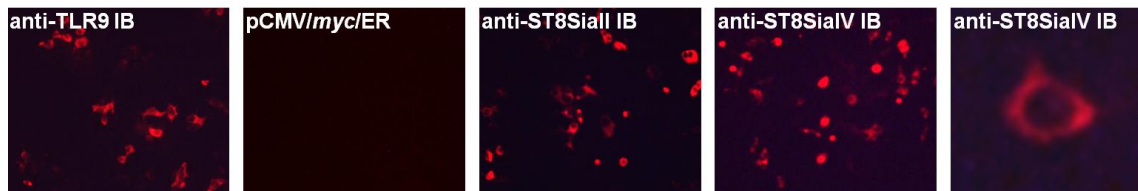


Abbildung 3.7: Expressionsanalyse der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV mittels Immunfluoreszenz. Immunfärbung von transient transfizierten HEK293-Zellen mit Maus anti-myc 9E10 und Ziege anti-Maus TRITC-konjugiertem Antikörper. Die Aufnahmen zeigen eine 100-fache Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop. Die jeweilige Färbung zeigt Zellen transfiziert mit dem Expressionsplasmid eines anti-TLR9 Intrabody (Positivkontrolle), mit leerem pCMV/*myc*/ER-Vektor (Negativkontrolle), dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody und dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaIV Intrabody sowie eine vergrößerte Darstellung einer Zelle mit anti-ST8SiaIV Intrabody. IB: Intrabody.

Für die Expressionsanalyse mittels Immunblot werden die Transfektionen analog zur Immunfluoreszenz durchgeführt. Als Positiv- und Negativkontrolle dient wieder das Expressionsplasmid des anti-TLR9 Intrabody und der leere Vektor pCMV/*myc*/ER. Drei Tage nach der Transfektion werden die Zellen lysiert und die Proteinlysate in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Proteine werden auf eine PVDF-Membran übertragen und die Intrabodies über das myc-Tag detektiert (Abb. 3.8). In der Positivkontrolle erscheint wie in den beiden Ansätzen mit den Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV eine Proteinbande bei ca. 30 kDa, was der erwarteten Größe der exprimierten Intrabody-Proteine entspricht.

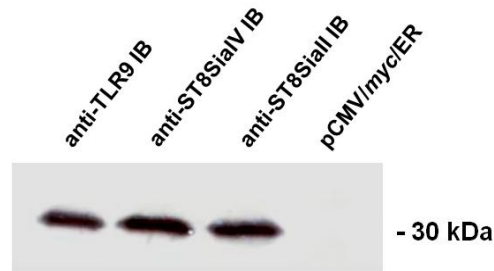


Abbildung 3.8: Expressionsanalyse der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV mittels Immunblot. Detektion der Intrabodies in Zelllysaten von transient transfizierten HEK293-Zellen mit Maus anti-myc 9E10 und Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper im Immunblot. Als Positivkontrolle dient das Lysat von mit dem Expressionsplasmid eines anti-TLR9 Intrabody transfizierten Zellen, als Negativkontrolle der leere Vektor pCMV/myc/ER. IB: Intrabody. kDa: Kilodalton.

3.2 Charakterisierung der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV

3.2.1 Nachweis der Bindung zwischen den Intrabodies und den Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV sowie der ER-Retention

Um die Bindung der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV an die Polysialyltransferasen zu überprüfen, werden für einen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) zunächst die originalen Maus anti-ST8SiaII (3167) und Maus anti-ST8SiaIV Antikörper (3175) in einer Verdünnungsreihe mit den entsprechenden löslichen und aufgereinigten Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV inkubiert (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH). Als Negativkontrolle wird der Maus anti-ST8SiaIV Antikörper durch Maus anti-myc 9E10 ersetzt. Die Detektion der Antikörper erfolgt mit Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper anhand des Farbumschlags des Substrats und anschließender Messung bei 450 nm im Fotometer (Abb. 3.9). Dabei ist ein deutliches Signal für die Antikörper anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV noch bis zur geringsten eingesetzten Menge von ~16 ng pro Antikörper feststellbar. Für den Antikörper anti-ST8SiaIV zeigen sich geringere Werte als für anti-ST8SiaII, die sich aber dennoch von der Negativkontrolle absetzen.

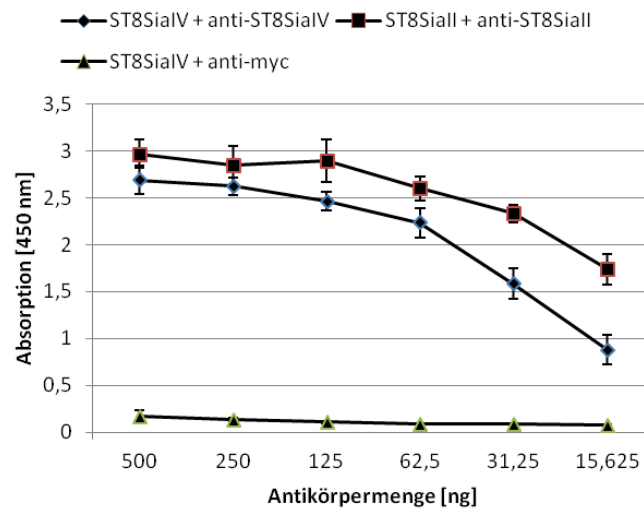


Abbildung 3.9: Bindungsanalyse der originalen Maus Antikörper gegen ST8SiaII und ST8SiaIV mittels ELISA. Detektion durch Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper der in einer Verdünnungsreihe mit den fixierten Polysialyltransferasen inkubierten Antikörper. Das Diagramm zeigt die Absorption bei 450 nm aufgetragen gegen die eingesetzte Antikörpermenge der Antikörper anti-ST8SiaII (Quadrat, rot) und anti-ST8SiaIV (Raute, blau) sowie der Negativkontrolle mit Maus anti-myc 9E10 Antikörper und ST8SiaIV als Antigen (Dreieck, grün). ng: Nanogramm. nm: Nanometer.

Um die Bindung der aus den Antikörpern anti-ST8SiaII (3167) und anti-ST8SiaIV (3175) generierten Intrabodies im ELISA zu analysieren und mit den Originalantikörpern vergleichen zu können, werden HEK293-Zellen mittels *Lipofectamine 2000* für eine hohe Transfektionsrate mit den jeweiligen Intrabody-Expressionsplasmiden transient transfiziert, da sich eine Aufreinigung der Intrabodies als zu aufwendig erweisen würde. Drei Tage nach der Transfektion werden die Zellen lysiert und das Zelllysate in einer Verdünnungsreihe mit den Polysialyltransferasen inkubiert. Als Negativkontrolle dient das Lysat von nur mit leerem Vektor pCMV/myc/ER transfizierten HEK293-Zellen. Die Detektion der Intrabodies erfolgt in diesem Fall mit Maus anti-myc 9E10 und Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper (Abb. 3.10). Die Lysate der mit den Intrabody-Expressionsplasmiden transfizierten HEK293-Zellen zeigen dabei ebenso wie die Originalantikörper (Abb. 3.9) einen deutlichen Farbumschlag, auch wenn bei diesem Ansatz die Absorption sowie der Unterschied zu den Negativkontrollen weniger hoch ausfällt.

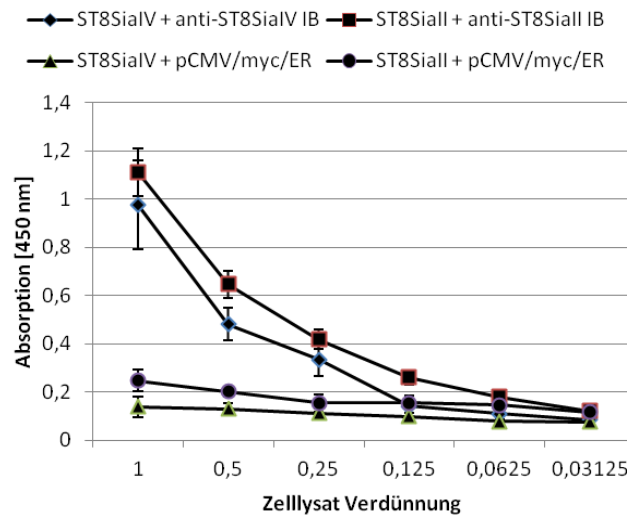


Abbildung 3.10: Bindungsanalyse der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies mittels ELISA.

Detektion durch Maus anti-myc 9E10 und Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper der in einer Verdünnungsreihe mit den fixierten Polysialyltransferasen inkubierten Intrabodies aus HEK293-Zelllysaten. Das Diagramm zeigt die Absorption bei 450 nm aufgetragen gegen die eingesetzte Verdünnung der Zelllysate mit den Intrabodies anti-ST8SiaII (Quadrat, rot) und anti-ST8SiaIV (Raute, blau). Als Negativkontrollen dienen Zelllysate von mit leerem pCMV/myc/ER-Vektor transfizierten Zellen mit den Polysialyltransferasen ST8SiaII (Dreieck, grün) und ST8SiaIV (Kreis, violett) als Antigen. IB: Intrabody. nm: Nanometer.

Um die Bindung der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV an die Polysialyltransferasen zu bestätigen, wird eine Immunpräzipitation (IP) der Transferasenproteine sowie eine Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) der Transferasenproteine mit den Intrabodies durchgeführt. Für die IP werden HEK293-Zellen mit Expressionsplasmiden für die Polysialyltransferasen transfiziert, bei denen die Transferasen mit einem FLAG- und einem HA-Tag fusioniert sind (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH; Windfuhr *et al.*, 2000). Als Negativkontrolle dient der leere Vektor pcDNA3-FLAG-HA. Für die Ko-IP werden die Intrabody-Expressionsplasmide mit den Polysialyltransferasen kotransfiziert. Als Negativkontrolle dient in diesem Fall der leere Vektor pcDNA3-FLAG-HA zusammen mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody. Drei Tage nach der Transfektion werden die Zellen lysiert und das Zelllysate mit dem jeweiligen präzipitierenden Antikörper inkubiert. Für die IP soll die Präzipitation über das HA-Tag der exprimierten Polysialyltransferasen erfolgen, für die Ko-IP über das myc-Tag der exprimierten Intrabodies. Im darauf folgenden Immunblot werden die Polysialyltransferasen dann über das FLAG-Tag detektiert (Abb. 3.11). In der IP zeigen sich im Vergleich zur Negativkontrolle Banden für die erwarteten Größen

der Polysialyltransferasen von 60 kDa für ST8SiaII und 55 kDa für ST8SiaIV. Neben dieser Bande zeigen sich aber auch diverse weitere mit einem geringeren Molekulargewicht, die jeweils den verschiedenen Glykosylierungsstufen der Proteine entsprechen. In der Ko-IP zeigt sich prinzipiell ein gleiches Resultat, auch wenn die Intensität und Deutlichkeit der Banden etwas vom Ergebnis der IP abweicht.

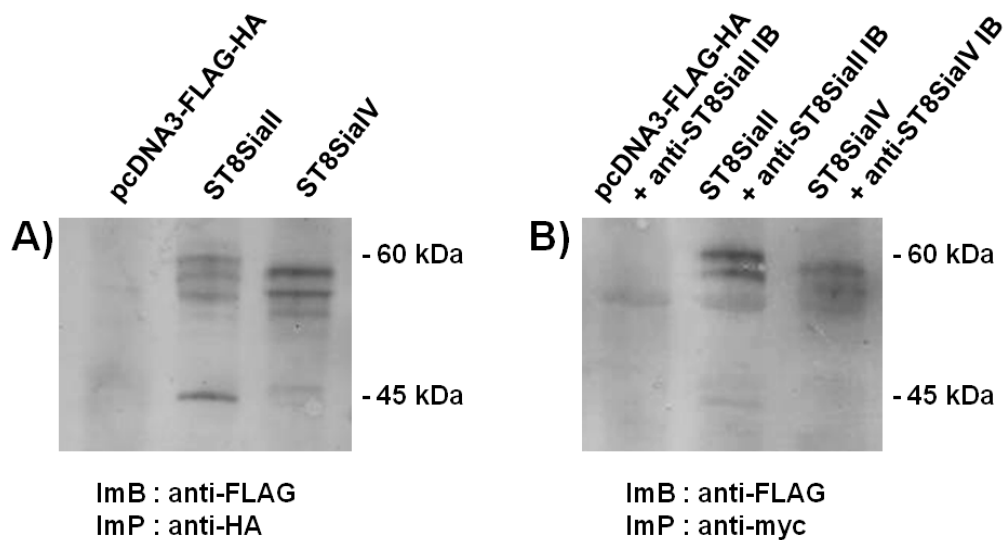


Abbildung 3.11: Immunpräzipitation der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV sowie Bindungsanalyse der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV mittels Ko-Immunpräzipitation.

Detektion der Polysialyltransferasen mit Maus anti-FLAG M5 und Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper im Immunblot nach IP und Ko-IP in HEK293-Zelllysaten. A) Immunpräzipitation mit anti-HA 12CA5 Antikörper im Zelllysate von mit leerem Vektor pcDNA3-FLAG-HA transfizierten Zellen (Negativkontrolle), mit dem Expressionsplasmid für ST8SiaII und mit dem Expressionsplasmid für ST8SiaIV transfizierten Zellen. B) Ko-Immunpräzipitation mit anti-myc 9E10 Antikörper im Zelllysate von mit leerem Vektor pcDNA3-FLAG-HA sowie dem Expressionsplasmid für den anti-ST8SiaII Intrabody kotransfizierten Zellen (Negativkontrolle), mit den Expressionsplasmiden für ST8SiaII und anti-ST8SiaII Intrabody sowie mit den Expressionsplasmiden für ST8SiaIV und anti-ST8SiaIV Intrabody kotransfizierten Zellen. IB: Intrabody. ImB: Immunblot. ImP: Immunpräzipitation. kDa: Kilodalton.

Als letzter Nachweis der Bindung zwischen den Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV und den Polysialyltransferasen soll die ER-Retention der Transferasen bei Expression der Intrabodies auf zellulärer Ebene mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden. Dafür werden CHO-Zellen eingesetzt, die jeweils nur eine der Polysialyltransferasen mit FLAG- und HA-Tag exprimieren. Generiert wurden sie, indem die Deletionsmutante CHO-2A10 jeweils mit den Expressionsplasmiden für die Polysialyltransferasen mit FLAG- und HA-Tag stabil transfiziert wurde (Dr. Martina

Mühlenhoff, MHH; Mühlenhoff *et al.*, 2001). Die Deletionsmutante weist im Gegensatz zum Wildtyp, der nur die Polysialyltransferase ST8SiaIV exprimiert, keine Expression der Polysialyltransferasen auf.

Die Zelllinien CHO-2A10+500 (ST8SiaII) und CHO-2A10+418 (ST8SiaIV) werden mit den entsprechenden Intrabody-Expressionsplasmiden transient transfiziert und drei Tage nach der Transfektion für eine Immunfärbung verwendet. Als Negativkontrolle dient in beiden Fällen das Expressionsplasmid des Intrabodies, der die in der jeweiligen Zelllinie exprimierte Polysialyltransferase nicht erkennt. Die Polysialyltransferasen werden über das FLAG-Tag detektiert, die Intrabodies über das myc-Tag. Um der Expression der Intrabodies und der Polysialyltransferasen das entsprechende Zellkompartiment zuzuordnen, wird das ER über das Markerprotein Calnexin und der Golgi-Apparat über das Markerprotein α -Mannosidase II angefärbt. (Abb. 3.12 und 3.13). Die Färbung des ER-Markers Calnexin zeigt in Überlagerung mit der Färbung der Intrabodies ihre Lokalisation im ER. Gleiches zeigt sich für die Lokalisation der Polysialyltransferasen im Golgi-Apparat, deren Färbung sich mit der des Golgi-Markers α -Mannosidase II deckt. Bei gleichzeitiger Expression der Intrabodies liegen die Polysialyltransferasen dann mit den Intrabodies im ER kolokalisiert vor, und eine Lokalisation im Golgi-Apparat ist nicht mehr erkennbar. Im Fall der Negativkontrolle sind die Polysialyltransferasen dagegen weiterhin im Golgi-Apparat zu erkennen.

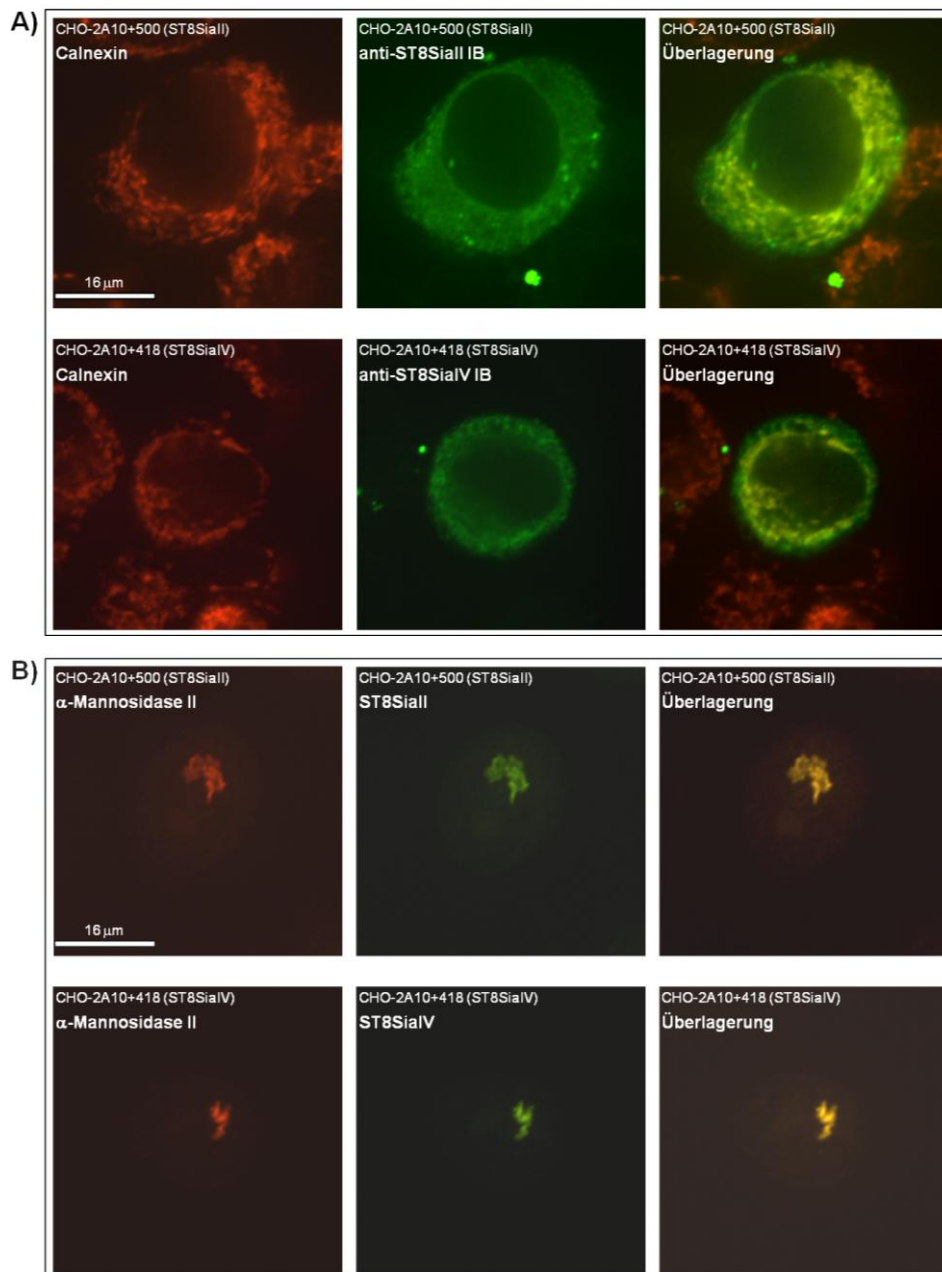


Abbildung 3.12: Nachweis der ER-Lokalisation der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies sowie der Golgi-Lokalisation der Polysialyltransferasen mittels Immunfluoreszenz. Aufnahmen der Immunfärbung am konfokalen Lasermikroskop. A) Die obere Reihe zeigt CHO-2A10+500-Zellen (ST8SiaII) transfiziert mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody, die untere Reihe CHO-2A10+418-Zellen (ST8SiaIV) transfiziert mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaIV Intrabody. Gezeigt ist jeweils die Färbung des ER-Markers Calnexin mit Maus anti-Calnexin AF18 und Ziege anti-Maus Cy3-konjugiertem Antikörper, des Intrabody mit Ziege anti-myc FITC-konjugiertem Antikörper und die Überlagerung beider Bilder. B) Die obere Reihe zeigt nicht transfizierte CHO-2A10+500-Zellen (ST8SiaII) und die untere Reihe nicht transfizierte CHO-2A10+418-Zellen (ST8SiaIV). Gezeigt ist jeweils die Färbung des Golgi-Markers α -Mannosidase II mit Kaninchen anti- α -Mannosidase II (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH; Velasco *et al.*, 1993) und Ziege anti-Kaninchen Cy3-konjugiertem Antikörper, der Polysialyltransferasen mit Maus anti-FLAG M5 und Ziege anti-Maus FITC-konjugiertem Antikörper und die Überlagerung beider Bilder. IB: Intrabody. μ m: Mikrometer.

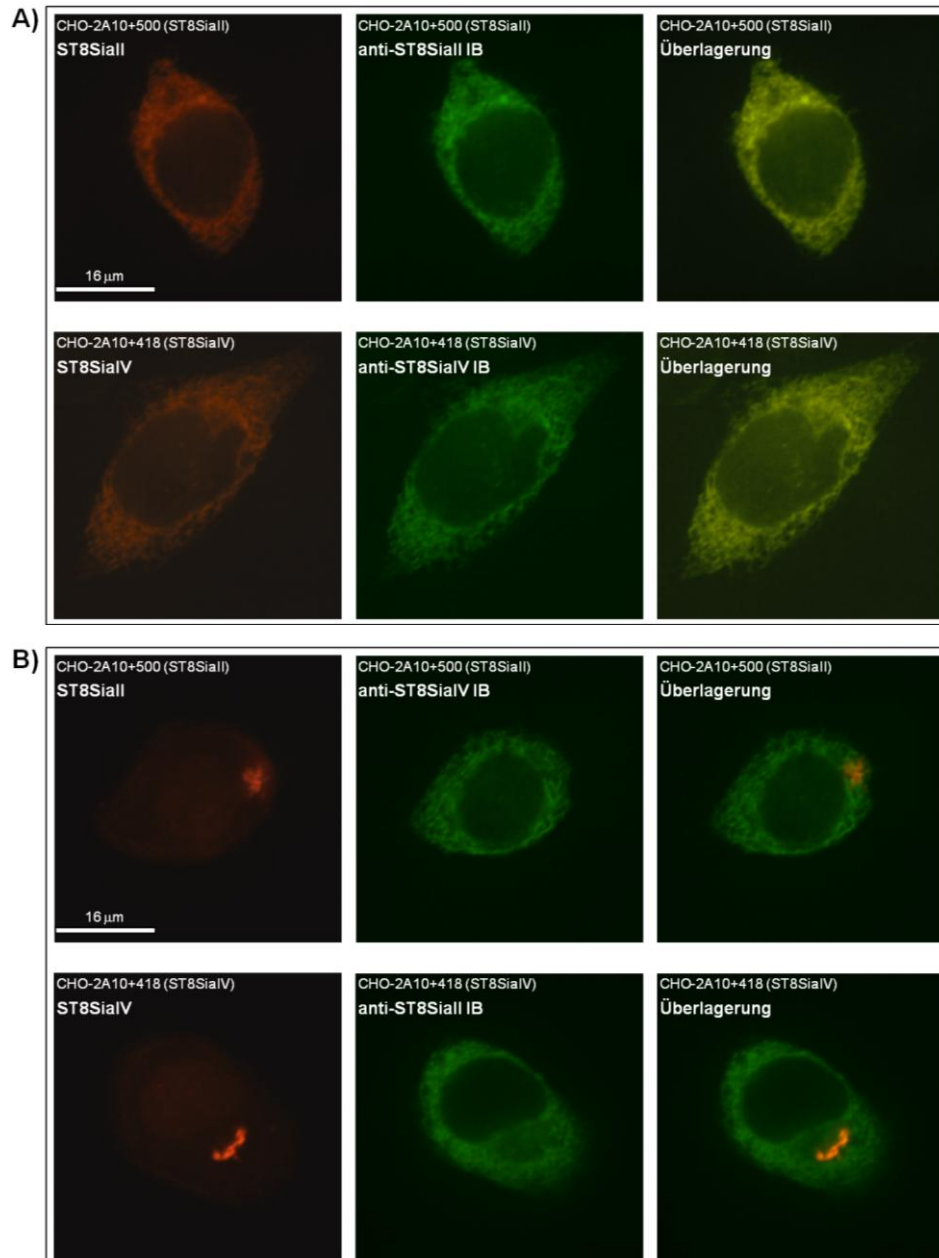


Abbildung 3.13: Nachweis der ER-Retention der Polysialyltransferasen durch Expression der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies mittels Immunfluoreszenz. Aufnahmen der Immunfärbung am konfokalen Lasermikroskop. A) Die obere Reihe zeigt CHO-2A10+500-Zellen (ST8SiaII) transfiziert mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody, die untere CHO-2A10+418-Zellen (ST8SiaIV) transfiziert mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaIV Intrabody. Gezeigt ist jeweils die Färbung der Polysialyltransferasen mit Maus anti-FLAG M5 und Ziege anti-Maus Cy3-konjugiertem Antikörper, der Intrabodies mit Ziege anti-myc FITC-konjugiertem Antikörper und die Überlagerung beider Bilder. B) Negativkontrolle: Die obere Reihe zeigt CHO-2A10+500-Zellen (ST8SiaII) transfiziert mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaIV Intrabody, die untere CHO-2A10+418-Zellen (ST8SiaIV) transfiziert mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody. Gezeigt ist jeweils die Färbung der Polysialyltransferasen mit Maus anti-FLAG M5 und Ziege anti-Maus Cy3-konjugiertem Antikörper, der Intrabodies mit Ziege anti-myc FITC-konjugiertem Antikörper und die Überlagerung beider Bilder. IB: Intrabody. µm: Mikrometer.

3.2.2 Nachweis der reduzierten Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM durch Expression der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV

Um die Reduzierung der Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM durch die Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV nachzuweisen, werden CHO-2A10+500- (ST8SiaII) und CHO-2A10+418-Zellen (ST8SiaIV) jeweils mit den entsprechenden Intrabody-Expressionsplasmiden transient transfiziert. Im Gegensatz zu den Bindungsnachweisen (3.2.1) muss die Analyse in diesem Fall aber zu einem späteren Zeitpunkt als drei Tage nach der Transfektion erfolgen, da Vorversuche zeigten, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine reduzierte Expression von polysialyliertem NCAM an der Zelloberfläche nachzuweisen ist. Durch die transiente Transfektion lässt sich dieser Zeitpunkt aber nicht beliebig verlängern, sodass vorab getestet werden soll, wie lange die Intrabodies in den Zellen exprimiert werden. Zu diesem Zweck werden CHO-2A10+500-Zellen jeweils mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody transient transfiziert. Im Abstand von zwei Tagen werden die einzelnen Ansätze dann lysiert und die Intrabodies über das myc-Tag immunpräzipitiert (Abb. 3.14). Im Immunblot zeigt sich, dass auch sechs Tage nach der Transfektion noch ein zum Anfang vergleichbar starkes Signal für den Intrabody im Immunblot festzustellen ist. Danach ist bereits eine deutliche Abnahme zu beobachten, bis hin zur fast völligen Abwesenheit des Signals nach zwölf Tagen. Der Zeitpunkt für die Analysen zur reduzierten Oberflächenexpression des polysialylierten NCAM wird demzufolge auf sechs Tage nach der Transfektion festgelegt.

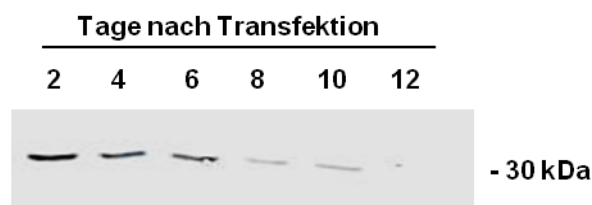


Abbildung 3.14: Ermittlung der Expressionsdauer des anti-ST8SiaII Intrabody nach transienter Transfektion von CHO-2A10+500-Zellen mittels Immunpräzipitation. Detektion des alle zwei Tage nach Transfektion mit anti-myc 9E10 Antikörper immunpräzipitierten Intrabody anti-ST8SiaII aus Zelllysaten von CHO-2A10+500-Zellen mit Maus anti-myc 9E10 und Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper im Immunblot. kDa: Kilodalton.

Die Zelllinien CHO-2A10+500 (ST8SiaII) und CHO-2A10+418 (ST8SiaIV) werden mit den Expressionsplasmiden der Intrabodies ST8SiaII und ST8SiaIV transient transfiziert und sechs Tage nach der Transfektion für die Analyse mittels Durchflusszytometrie präpariert. Die Detektion der Polysialinsäure erfolgt dabei über den anti-polySia 735 Antikörper (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH; Frosch *et al.*, 1985). Als Negativkontrolle für beide Zelllinien dient die Transfektion der Zellen mit dem Expressionsplasmid des Intrabodies, welcher die in der jeweiligen Zelllinie exprimierte Polysialyltransferase nicht erkennt. Als Positivkontrolle wird eine ursprünglich aus dem Bakteriophagen K1F stammende Endosialidase verwendet (Endo-NF; Dr. Martina Mühlenhoff, MHH; Stummeyer *et al.*, 2005), die durch Inkubation mit den Zellen die Polysialinsäure bis auf einen Zuckerrest entfernen kann, sodass sie nicht mehr durch den anti-polySia 735 Antikörper erkannt werden kann. Alle Ansätze werden mit nicht transfizierten Zellen verglichen. (Abb. 3.15). Im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen zeigt sich für die Positivkontrolle beim Einsatz der Endosialidase eine nahezu vollständiger Verlust des Signals für Polysialinsäure. Für die Negativkontrolle ist jeweils eine leichte Reduzierung des Signals zu beobachten. Bei Expression der Intrabodies nimmt diese Reduzierung hingegen zu. Neben der Verschiebung des jeweiligen Signals fällt außerdem in allen Ansätzen auf, dass das Signal für Polysialinsäure zwei Intensitätshöhepunkte aufweist.

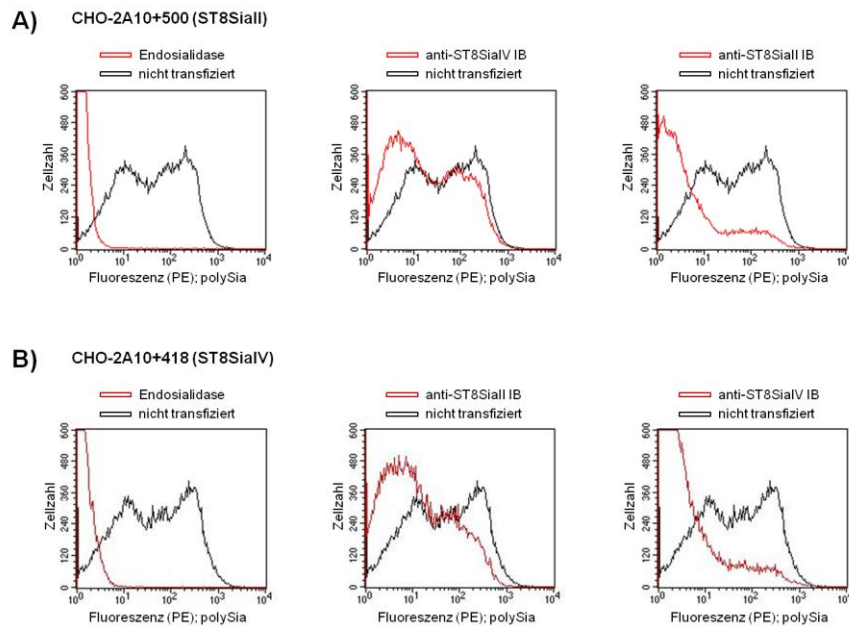


Abbildung 3.15: Nachweis der reduzierten Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM auf rekombinanten CHO-Zellen durch Expression der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies mittels Durchflusszytometrie. Durchflusszytometrische Analyse der auf der Zelloberfläche von transient transfizierten CHO-Zellen exprimierten Polysialinsäure mittels Maus anti-polySia 735 und Ziege anti-Maus PE-konjugiertem Antikörper. Tote Zellen sind durch Markierung mit Propidiumjodid aus der Messung ausgeschlossen. A) Nicht transfizierte CHO-2A10+500-Zellen (ST8SiaII; schwarz) sind der Positivkontrolle mit Endosialidase behandelten Zellen gegenüber gestellt, ebenso der Negativkontrolle der mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaIV Intrabody transfizierten Zellen sowie den mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody transfizierten Zellen (rot). B) Nicht transfizierte CHO-2A10+418-Zellen (ST8SiaIV; schwarz) sind der Positivkontrolle mit Endosialidase behandelten Zellen gegenüber gestellt, ebenso der Negativkontrolle der mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody transfizierten Zellen sowie den mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaIV Intrabody transfizierten Zellen (rot). IB: Intrabody. PE: Phycoerythrin. polySia: Polysialinsäure.

Um die Reduzierung der Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM auf den CHO-Zellen durch Expression der Intrabodies ST8SiaII und ST8SiaIV weiter zu untersuchen und um festzustellen, ob die Expression des NCAM dadurch beeinflusst wird, soll sowohl die Polysialinsäure als auch das NCAM mittels Immunblot detektiert werden. Dazu werden die Zelllinien CHO-2A10+500 (ST8SiaII) und CHO-2A10+418 (ST8SiaIV) mit den entsprechenden Intrabody-Expressionsplasmiden transient transfiziert. Sechs Tage nach Transfektion werden die Zellen lysiert und die Polysialinsäure und das NCAM im Immunblot detektiert. Als Negativkontrolle dienen nicht transfizierte sowie mit leerem pCMV/*myc*/ER-Vektor transfizierte Zellen, um zu überprüfen, ob sich die leicht reduzierte Expression des polysialylierten NCAM in der Negativkontrolle der durchflusszytometrischen Analyse (Abb. 3.15) auch im Zusammenhang

mit dem leeren Vektor zeigt. Als Positivkontrolle dienen Zellen, bei denen das Zelllysate mit Endosialidase inkubiert wird (Abb. 3.16). Bei den nicht transfizierten Zellen zeigt sich das Signal für die Polysialinsäure in unbestimmter Größe im hochmolekularen Bereich, während für NCAM je eine Bande für die Isotypen NCAM-140 und NCAM-180 bei 140 und 180 kDa detektiert werden kann. Mit Expression der entsprechenden Intrabodies nimmt die Intensität des Signals für die Polysialinsäure ab, während die Bandenintensität für NCAM-140 zunimmt. In abgeschwächter Form ist dies auch für die Negativkontrolle bei Transfektion des leeren Vektors zu beobachten, sodass sich hier eine Parallele zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie zeigt. In der Positivkontrolle ist bei Einsatz der Endosialidase das Signal für die Polysialinsäure schließlich nicht mehr nachzuweisen, und die Bande für NCAM-140 erscheint am ausgeprägtesten. Die Zunahme des Signals für NCAM-140 von den nicht transfizierten Zellen über die Negativkontrolle und den Intrabody-exprimierenden Zellen bis hin zur Positivkontrolle fällt für die CHO-2A10+418-Zellen (ST8SiaIV) deutlicher aus.

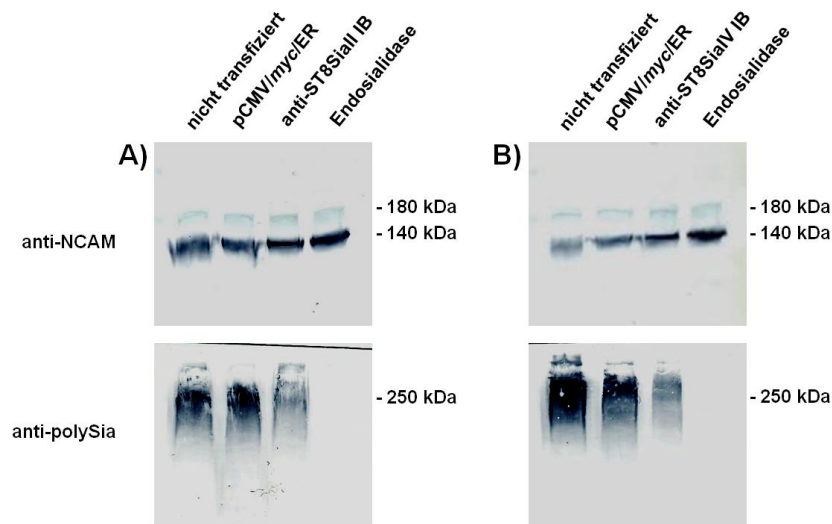


Abbildung 3.16: Nachweis der reduzierten Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM bei rekombinanten CHO-Zellen durch Expression der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies sowie Detektion von NCAM mittels Immunblot. Detektion von Polysialinsäure mittels Maus anti-polySia 735 und Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper (oben) sowie des NCAM durch Ratte anti-NCAM H28 (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH; Hirn et al., 1983) und Ziege anti-Ratte Peroxidase-konjugiertem Antikörper (unten) im Immunblot. A) Zelllysate von nicht transfizierten CHO-2A10+500-Zellen (ST8SiaII), mit leerem Vektor pCMV/myc/ER transfizierten Zellen (Negativkontrolle), und mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody transfizierten Zellen sowie mit Endosialidase behandeltes Zelllysate (Positivkontrolle). B) Zelllysate von nicht transfizierten CHO-2A10+418-Zellen (ST8SiaIV), mit leerem Vektor pCMV/myc/ER transfizierten Zellen (Negativkontrolle) und mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaIV Intrabody transfizierten Zellen sowie mit Endosialidase behandeltes Zelllysate (Positivkontrolle). IB: Intrabody. kDa: Kilodalton.

3.3 *In vivo* Funktionsanalyse der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV

3.3.1 Generierung von stabilen Intrabody-exprimierenden TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Humane TE671-Rhabdomyosarkom-Zellen exprimieren beide Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV und weisen fast vollständig polysialyliertes NCAM an der Zelloberfläche auf. Eine intraperitoneale (i.p.) oder intramuskuläre (i.m.) Injektion der Zellen in Mäuse führt zur Tumorbildung und nach einigen Wochen zur Metastasierung in Lunge und/oder Leber (Daniel *et al.*, 2001). Um den Effekt der reduzierten Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM durch Expression der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV auf die Metastasierung *in vivo* untersuchen zu können, sollen beide Intrabodies stabil in TE671-Zellen exprimiert werden. Zu diesem Zweck muss einer der Intrabodies mit einem anderen Detektions-Tag und für die Selektion der transfizierten Zellen mit einer anderen Antibiotikaresistenz ausgestattet werden. Dafür wird die DNA-Sequenz des anti-ST8SiaII Intrabody durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *SalI* und *XbaI* in einen Vektor mit einer Zeocin-Resistenz (anstatt der Neomycin-Resistenz des pCMV/*myc*/ER-Vektors) umkloniert. Verwendet wird dafür das Expressionsplasmid des anti-VEGFR-2 Intrabody, pSV40/Zeo/A7 (Böldicke *et al.*, 2005). Anschließend folgt eine ortsspezifische Mutagenese, bei der die Sequenz des *myc*-Tags durch die Sequenz eines HA-Tags ersetzt wird. Zuletzt wird die DNA-Sequenz des auf diese Weise neu generierten Expressionsplasmids für den anti-ST8SiaII Intrabody per Sequenzierung überprüft und dessen unveränderte Expression und Funktion mittels Immunblot und Immunfluoreszenz sowie Durchflusszytometrie verifiziert.

Zur Herstellung von stabilen Intrabody-exprimierenden TE671-Zellen werden die Zellen zuerst mit dem neu generierten Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody transfiziert und stabile Klone mittels des Antibiotikums Zeocin selektioniert. Diese Klone werden dann mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaIV Intrabody transfiziert und mit Neomycin selektioniert. Die so generierten Klone werden sowohl hinsichtlich der Expression beider Intrabodies mittels Immunfluoreszenz als auch auf Funktionalität mittels Durchflusszytometrie getestet. Die besten Klone werden

schließlich für eine dritte Transfektion mit dem Expressionsplasmid einer Luziferase verwendet (pVBC3luc2puro; Dr. Andrea Kröger, HZI), bei dem die Selektion dann mit Puromycin erfolgt. Die Luziferase soll bei der *in vivo* Funktionsanalyse bei Injektion des entsprechenden Substrats (Luziferin) die Detektion der stabilen Zellen in der Maus durch ihre Luminiszenz ermöglichen. Nach Bestimmung der Luziferaseaktivität werden die Klone mit den höchsten Werten weiter verwendet. Als Negativkontrolle für die *in vivo* Anwendung werden Zellen mit dem leeren Vektor pCMV/*myc*/ER und dem Luziferase-Expressionsplasmid transfiziert und selektioniert. Des Weiteren werden TE671-Zellen mit dem Expressionsplasmid eines anti-NCAM Intrabody generiert (ebenfalls pCMV/*myc*/ER; Dr. Thomas Böldicke, HZI; Böldicke *et al.*, 2012), um einen Vergleich zwischen der reduzierten Oberflächenexpression des NCAM und der reduzierten Oberflächenexpression des polysialylierten NCAM ziehen zu können.

Der anti-NCAM Intrabody wurde zum Teil bereits charakterisiert, und die reduzierte Oberflächenexpression des NCAM auf TE671-Zellen durch Expression des Intrabody konnte nachgewiesen werden (Böldicke *et al.*, 2012). Um analog zu den Versuchen aus Kapitel 3.2.1 (Abb. 3.12 und 3.13) auch die Kolokalisation des Intrabody mit NCAM und damit die ER-Retention zeigen zu können, werden TE671-Zellen mit dem Expressionsplasmid des anti-NCAM Intrabody transient transfiziert. Als Negativkontrolle dient das Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody. Drei Tage nach der Transfektion werden die Zellen dann für eine Immunfärbung verwendet, bei der der Intrabody über das *myc*-Tag, das ER über das Markerprotein Calnexin und das NCAM angefärbt werden (Abb. 3.17). Die Färbung des ER-Markers Calnexin zeigt in Überlagerung mit der Färbung des anti-NCAM Intrabody die Kolokalisation im ER. Gleiches zeigt sich für das NCAM, welches kolokalisiert mit dem Intrabody vorliegt, wenn der anti-NCAM Intrabody exprimiert wird. In der Negativkontrolle hingegen, in der der anti-ST8SiaII Intrabody exprimiert wird, liegt das NCAM weiterhin an der Zelloberfläche vor.

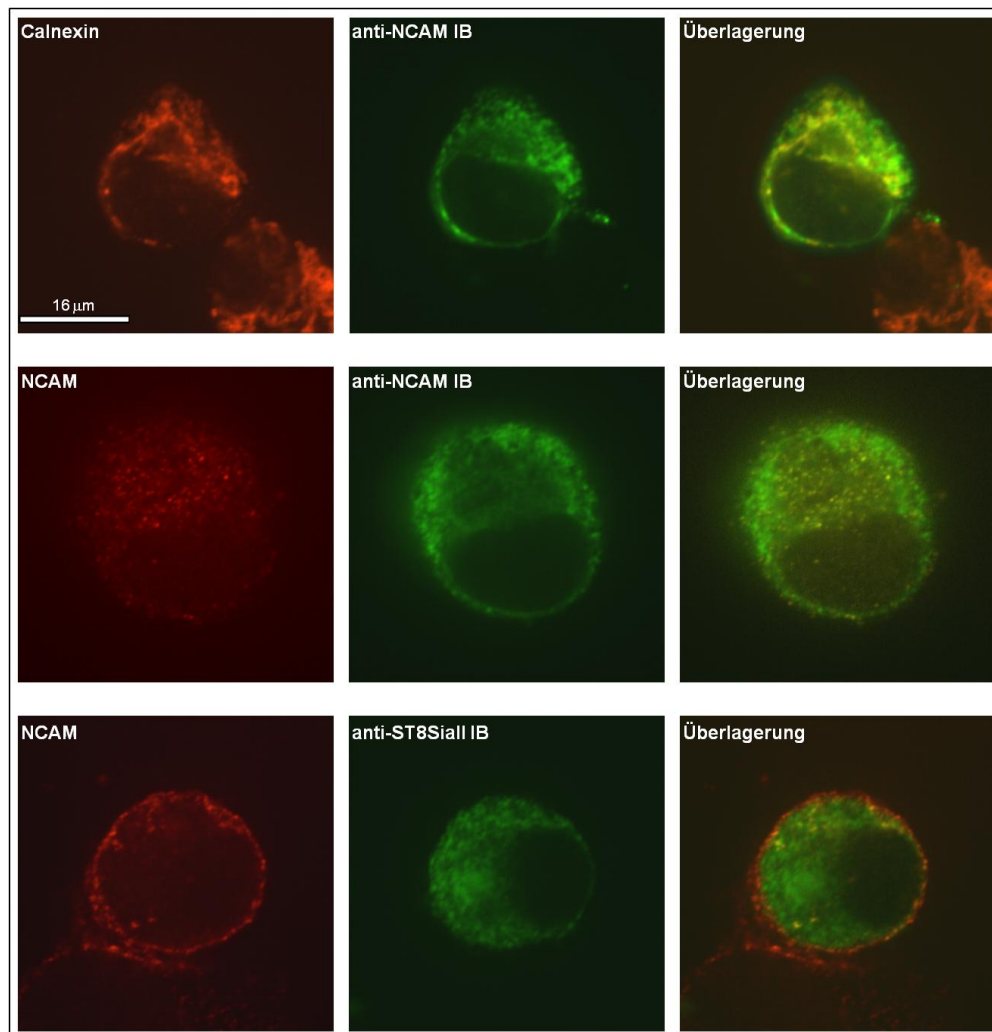


Abbildung 3.17: Nachweis der ER-Retention des NCAM durch Expression des anti-NCAM Intrabody mittels Immunfluoreszenz. Aufnahmen der Immunfärbung am konfokalen Lasermikroskop. Die beiden oberen Reihen zeigen TE671-Zellen transfiziert mit dem Expressionsplasmid des anti-NCAM Intrabody und die untere Reihe TE671-Zellen transfiziert mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaII Intrabody. Das ER-Markerprotein Calnexin ist mit Maus anti-Calnexin AF18 und Ziege anti-Maus Cy3-konjugiertem Antikörper, die Intrabodies mit Ziege anti-myc FITC-konjugiertem Antikörper und das NCAM mit Maus anti-NCAM ERIC-1 und Ziege anti-Maus Cy3-konjugiertem Antikörper angefärbt. Das letzte Bild zeigt jeweils die Überlagerung der ersten beiden Bilder. IB: Intrabody. NCAM: Neutrales Zelladhäsionsmolekül. µm: Mikrometer.

Die drei stabilen TE671-Zelllinien (pCMV/*myc*/ER + Luziferase, anti-NCAM Intrabody + Luziferase, anti-ST8SiaII Intrabody + anti-ST8SiaIV Intrabody + Luziferase) werden abschließend vor ihrer Verwendung *in vivo* mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie auf die unveränderte Expression und Funktionalität der Intrabodies überprüft. Außerdem wird in einem Zellproliferationsassay ermittelt, ob sich

das Wachstum der drei Zelllinien unterscheidet und somit in den *in vivo* Versuchen zu berücksichtigen wäre. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse der letztlich auch verwendeten Klone gezeigt (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Verwendete Klone der stabilen TE671-Zelllinien.

| TE671-Zelllinie: | Klon: |
|--|-------------------|
| anti-ST8SiaII IB + anti-ST8SiaIV IB + Luziferase | TE671-S4PST4Luc |
| pCMV/ <i>myc</i> /ER + Luziferase | TE671-LucpCMV1 |
| anti-NCAM IB + Luziferase | TE671-NCAMIB3Luc1 |

Im Proliferationsassay ist ein sich gleichender Verlauf für das Wachstum der verschiedenen Zelllinien festzustellen (Abb. 3.18 A). Für die Überprüfung der Expression mittels Immunfluoreszenz werden die Intrabodies anti-ST8SiaIV und anti-NCAM über das *myc*-Tag und der umklonierte anti-ST8SiaII über das HA-Tag gefärbt (Abb. 3.18 B). Die Überprüfung der Funktionalität mittels Durchflusszytometrie erfolgt durch Detektion der Polysialinsäure bzw. im Fall des anti-NCAM Intrabody durch Detektion des NCAM auf der Zelloberfläche. Als Negativkontrollen dienen jeweils nicht transfizierte TE671-Zellen. Als Positivkontrolle werden mit Endosialidase behandelte Zellen bei Detektion der Polysialinsäure und ohne anti-NCAM Antikörper behandelte Zellen bei Detektion des NCAM verwendet (Abb. 3.18 C). In der Immunfluoreszenz zeigt sich für die Intrabodies eine relativ gleichmäßige und vollständige Färbung aller Zellen. In der Durchflusszytometrie ist für die Zelllinie mit dem anti-NCAM Intrabody eine fast komplette Verschiebung des Signals für NCAM auf der Zelloberfläche zu beobachten. Für die Zelllinie mit den Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV ist zwar für die Polysialinsäure ebenfalls ein verschobenes Signal zu beobachten, doch fällt diese Verschiebung im Gegensatz zur Positivkontrolle und zur Zelllinie mit anti-NCAM Intrabody nicht vollständig aus. Die Kontrollzelllinie für die *in vivo* Versuche mit pCMV/*myc*/ER-Vektor zeigt keinen Effekt sowohl auf die Expression des NCAM als auch auf die Expression des polysialylierten NCAM.

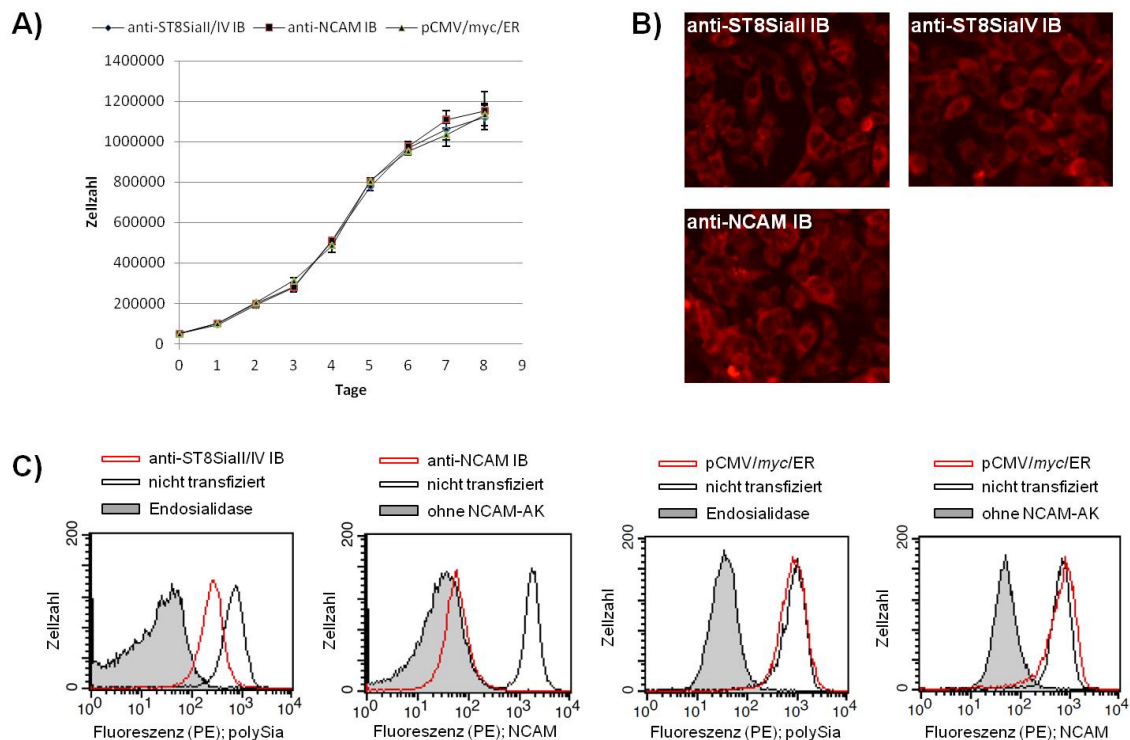


Abbildung 3.18: Proliferationsassay sowie Expressions- und Funktionsanalyse der stabilen Intrabody-exprimierenden TE671-Zelllinien mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie. Analysen der TE671-Zelllinie mit anti-ST8SialII Intrabody + anti-ST8SialIV Intrabody + Luziferase, anti-NCAM Intrabody + Luziferase und pCMV/myc/ER + Luziferase. A) Proliferationsassay der stabilen TE671-Zelllinien mit anti-ST8SialII Intrabody + anti-ST8SialIV Intrabody + Luziferase (Raute, blau), anti-NCAM Intrabody + Luziferase (Quadrat, rot) und pCMV/myc/ER + Luziferase (Dreieck, grün). Das Diagramm zeigt die Zellzahl aufgetragen gegen den Tag der Zellzahlbestimmung nach Aussaat von jeweils 5×10^4 Zellen. B) Immunfluoreszenz: Detektion der Intrabodies anti-ST8SialIV und anti-NCAM mit Maus anti-myc 9E10 und Ziege anti-Maus Cy3-konjugiertem Antikörper und von anti-ST8SialII Intrabody mit Maus anti-HA 12CA5 und Ziege anti-Maus Cy3-konjugiertem Antikörper (100-fache Vergrößerung). C) Durchflusszytometrische Detektion von Polysialinsäure mit Maus anti-polySia 735 und Ziege anti-Maus PE-konjugiertem Antikörper und von NCAM mit Maus anti-NCAM ERIC-1 und Ziege anti-Maus PE-konjugiertem Antikörper. Tote Zellen sind durch Markierung mit Propidiumjodid aus der Messung ausgeschlossen. Als Negativkontrollen sind jeweils nicht transfizierte Zellen (schwarze Linie) der Positivkontrolle mit Endosialidase-behandelten oder ohne anti-NCAM Antikörper inkubierten Zellen (graue Fläche) und den stabilen TE671-Zelllinien (rote Linie) gegenübergestellt. AK: Antikörper. IB: Intrabody. NCAM: Neurales Zelladhäsionsmolekül. PE: Phycoerythrin. polySia : Polysialinsäure.

Da die Reduzierung der Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM in der TE671-Zelllinie mit den Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV im Vergleich zur Reduzierung der Oberflächenexpression des NCAM in der Zelllinie mit anti-NCAM Intrabody weniger effektiv ausfällt (Abb. 3.18 A und B), sollen vor der *in vivo* Anwendung der Zelllinien daher noch einige der dafür möglichen Ursachen ausgeschlossen werden:

Als erste denkbare Ursache für die limitierte Reduzierung der Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM erscheint die Anwesenheit beider Polysialyltransferasen in den TE671-Zellen und die dadurch erforderliche gleichzeitige Expression der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV, die im Zusammenspiel unter Umständen weniger effektiv funktionieren als allein. Um dies auszuschließen, werden CHO-C6-Wildtypzellen, die nur die Polysialyltransferase ST8SiaIV exprimieren, analog zur Generierung der stabilen TE671-Zelllinien mit dem Expressionsplasmid des anti-ST8SiaIV Intrabody transfiziert und durch Einsatz von Neomycin selektioniert. Mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie wird diese Zelllinie dann auf Expression und Funktionalität des Intrabody getestet. Die Färbung des Intrabody erfolgt über das myc-Tag. Als Negativkontrolle für die durchflusszytometrische Detektion der Polysialinsäure dienen nicht transfizierte CHO-C6-Zellen, als Positivkontrolle mit Endosialidase behandelte Zellen (Abb. 3.19 A). In der Immunfluoreszenz ist eine relativ gleichmäßige und vollständige Färbung aller Zellen zu beobachten. Das Ergebnis für die Durchflusszytometrie zeigt aber, dass auch bei alleiniger Expression des anti-ST8SiaIV Intrabody sich das Signal für Polysialinsäure nur teilweise verschiebt. Damit unterscheidet sich die CHO-C6-Zelllinie mit anti-ST8SiaIV Intrabody hinsichtlich der unvollständigen Reduzierung der Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM nicht von der TE671-Zelllinie mit anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabody.

Die Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM wurde für die stabile anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabody-exprimierende TE671-Zelllinie bis zu diesem Zeitpunkt nur mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Um eine andere Methode zur Überprüfung der Ergebnisse zu verwenden, soll die Polysialinsäure und das NCAM auch im Immunblot detektiert werden. Als Negativkontrolle dienen nicht transfizierte TE671-Zellen, als Positivkontrolle mit Endosialidase behandelte (Abb. 3.19 B). Im Immunblot zeigt sich grundsätzlich ein vergleichbares Ergebnis wie in der

Durchflusszytometrie. Das Signal für die Polysialinsäure erscheint schwächer als für die Negativkontrolle, ist aber im Vergleich zur Positivkontrolle noch deutlich vorhanden. Dementsprechend verhält sich auch das Signal für NCAM-140, welches für die Zelllinie zwar im Vergleich zur Negativkontrolle bei 140 kDa vorhanden ist, aber nicht die Intensität des Signals der Positivkontrolle erreicht.

Als letzte Ursache für die unvollständige Reduzierung der Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM in der stabilen anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabody-exprimierenden TE671-Zelllinie wird untersucht, ob die Bindung zwischen Antikörper und Polysialyltransferase durch eine vorherige Bindung des NCAM an die Transferase verhindert wird. Auf diese Weise könnte eine eventuell vorliegende Konkurrenz um die Bindung der Polysialyltransferase in der Zelle zu einer nur teilweise erfolgreichen ER-Retention der Transferasen durch Expression der Intrabodies führen. Zu diesem Zweck wird ein ELISA durchgeführt, bei dem lösliches und aufgereinigtes NCAM-Protein (Dr. Martina Mühlenhoff, MHH) fixiert und mit dem originalen Maus-Antikörper gegen ST8SiaIV (3175) in einer Verdünnungsreihe inkubiert wird. In einem zweiten Ansatz wird die lösliche und aufgereinigte Polysialyltransferase ST8SiaIV in einem der Detektion vorgeschalteten Inkubationsschritt zum NCAM zugegeben. Auf diese Weise soll überprüft werden, ob die Detektion durch den Antikörper der an das NCAM gebundenen Polysialyltransferase gestört wird (Abb. 3.19 C). Im ELISA ist bei Zugabe des Antikörpers anti-ST8SiaIV zum NCAM keine Bindung zu beobachten. Wird aber die Polysialyltransferase ST8SiaIV zusammen mit NCAM inkubiert, so ergibt sich ein Kurvenverlauf, der weitestgehend dem der Detektion von ST8SiaIV ohne Bindung zu NCAM entspricht (Abb. 3.9). Die Komplexierung von ST8SiaIV und NCAM scheint die Bindung des Antikörpers also nicht zu beeinflussen.

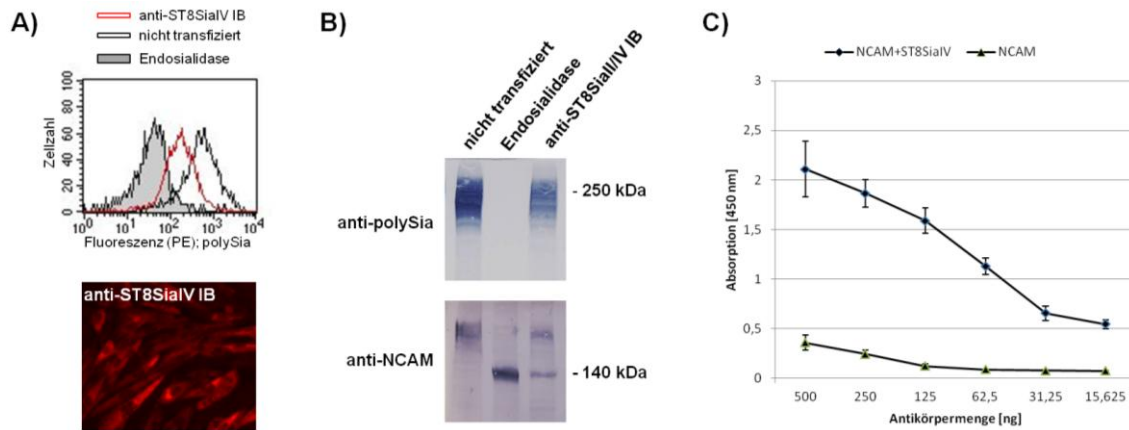


Abbildung 3.19: Untersuchungen zur unvollständigen Reduzierung der Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM in der stabilen anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabody-exprimierenden TE671-Zelllinie. A) Expressions- und Funktionsanalyse der stabilen anti-ST8SiaIV Intrabody-exprimierenden CHO-C6-Zelllinie mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie. Durchflusszytometrie (oben): Detektion von Polysialinsäure mit Maus anti-polySia 735 und Ziege anti-Maus PE-konjugiertem Antikörper (rote Linie) im Vergleich mit der Negativkontrolle mit nicht transfizierten Zellen (schwarze Linie) und der Positivkontrolle mit Endosialidase behandelten Zellen (graue Fläche). Immunfluoreszenz (unten): Detektion des anti-ST8SiaIV Intrabody mit Maus anti-myc 9E10 und Ziege anti-Maus Cy3-konjugiertem Antikörper. B) Immunblot: Detektion von Polysialinsäure mit Maus anti-polySia 735 und Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper (oben) und Detektion von NCAM mit Maus anti-NCAM ERIC-1 und Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper (unten) in Zelllysaten der stabilen anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabody-exprimierenden TE671-Zelllinie, der Negativkontrolle mit nicht transfizierten TE671-Zellen und der Positivkontrolle mit Endosialidase behandelten Zellen. C) ELISA: Detektion durch Ziege anti-Maus Peroxidase-konjugiertem Antikörper des in einer Verdünnungsreihe mit fixiertem NCAM inkubierten anti-ST8SiaIV Antikörpers (Dreieck, grün) und bei vorheriger Inkubation des fixierten NCAM mit der Polysialyltransferase ST8SiaIV (Raute, blau). Das Diagramm zeigt die Absorption bei 450 nm aufgetragen gegen die eingesetzte Antikörpermenge. IB: Intrabody. kDa: Kilodalton. ng: Nanogramm. nm: Nanometer. NCAM: Neurales Zelladhäsionsmolekül. PE: Phycoerythrin. polySia: Polysialinsäure.

3.3.2 Injektion der stabilen Intrabody-exprimierenden TE671-Zelllinien in immundefiziente Mäuse zur Visualisierung des Tumorwachstums und der Metastasierung

Für die *in vivo* Anwendung der generierten TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien pCMV/myc/ER + Luziferase, anti-NCAM Intrabody + Luziferase und anti-ST8SiaII Intrabody + anti-ST8SiaIV Intrabody + Luziferase werden zum Zeitpunkt des Beginns der Versuche zwanzig Wochen alte C57BL/6J RAG-2 Mäuse verwendet, die weder B-

und T-Zellen noch NK- und NKT-Zellen produzieren, damit die humanen TE671-Zellen nicht vom Immunsystem der Maus erkannt und bekämpft werden können. Pro Zelllinie bekommen jeweils drei Mäuse eine intraperitoneale Injektion (i.p.) von 10^6 Zellen und werden dann einmal pro Woche mittels *in vivo imaging system* (IVIS) untersucht. Dafür wird vor jeder Messung eine Luziferin-Lösung ebenfalls i.p. injiziert und das Tumorwachstum anhand der Luminiszenz der Zellen verfolgt (Abb. 3.20-3.22). In den Wochen 1-3 zeigen sich für jede Zelllinie in jeder Maus zunehmende Signale im Peritoneum, welche aber teilweise noch unregelmäßig ausfallen. In Woche 4 lassen sich für die Kontrolle mit der Zelllinie pCMV/*myc*/ER + Luziferase neue Signale in Lunge oder Leber feststellen. Gleiches zeigt sich auch im Fall der Zellen mit anti-NCAM Intrabody. Die Mäuse mit der Zelllinie anti-ST8SiaII Intrabody + anti-ST8SiaIV Intrabody + Luziferase zeigen dagegen wie in den Wochen zuvor weiterhin nur Signale im Peritoneum. Ein Vergleich der Intensitäten im Brustbereich der Mäuse (*region of interest*; ROI) in Woche 4 bestätigt den optischen Eindruck (Abb. 3.23). Erst in Woche 5 lassen sich auch hier einzelne Signale in Lunge oder Leber feststellen. In den anderen Mäusen ist in dieser Woche und für alle Mäuse auch in der folgenden letzten Woche das Signal bereits so intensiv, dass sich teilweise keine Unterscheidung mehr zwischen Peritoneum und dem Lunge/Leber-Bereich treffen lässt. Aufgrund des fortschreitenden Tumorwachstums wird der Versuch nach Woche 6 beendet.

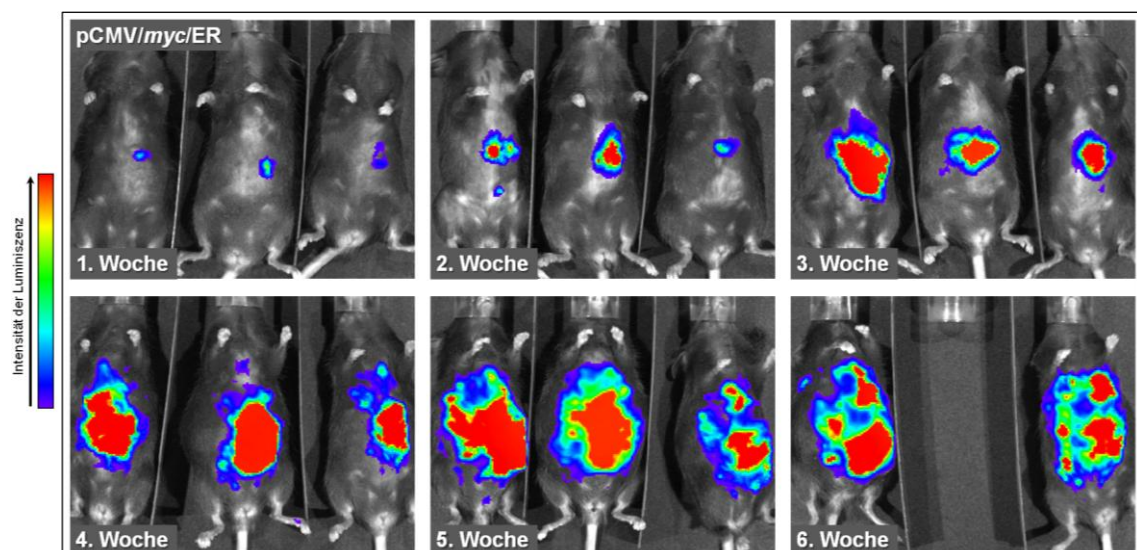


Abbildung 3.20: Visualisierung des Tumorwachstums nach intraperitonealer Injektion stabiler TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien in C57BL/6J RAG-2 Mäusen mittels IVIS. Wöchentliche Messung der Luminiszenz der Zellen der TE671-Zelllinie pCMV/*myc*/ER-Vektor + Luziferase durch Injektion einer Luziferin-Lösung.

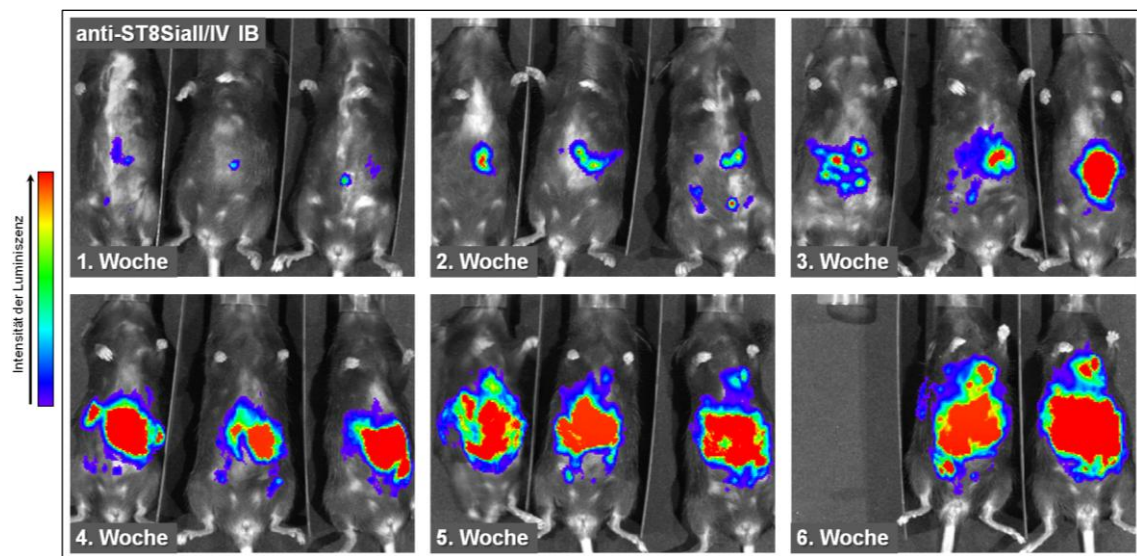


Abbildung 3.21: Visualisierung des Tumorwachstums nach intraperitonealer Injektion stabiler TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien in C57BL/6J RAG-2 Mäusen mittels IVIS. Wöchentliche Messung der Luminiszenz der Zellen der TE671-Zelllinie anti-ST8Siall Intrabody + anti-ST8Siall IV Intrabody + Luziferase durch Injektion einer Luziferin-Lösung. IB: Intrabody.

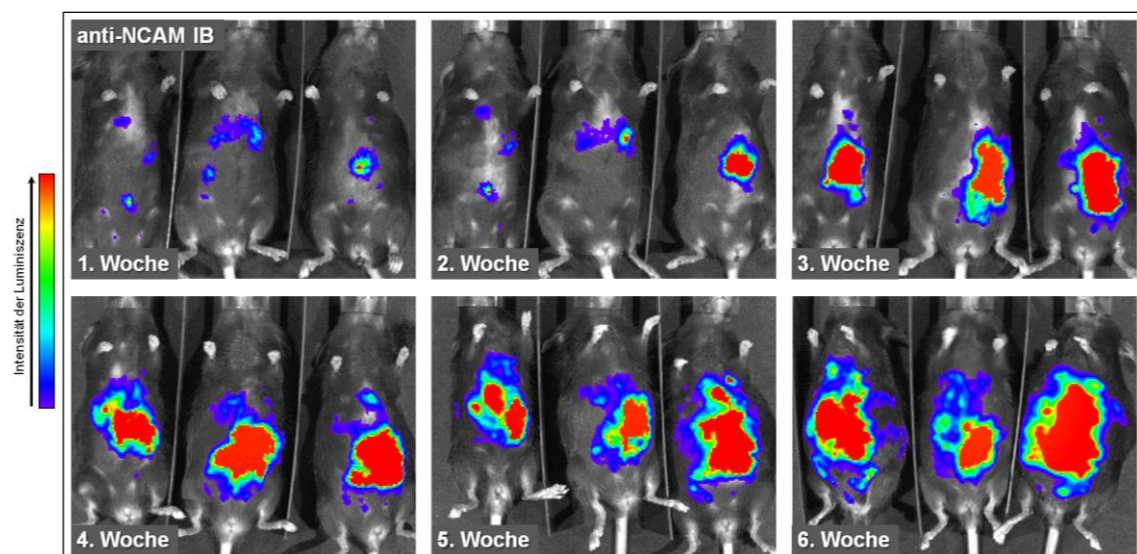


Abbildung 3.22: Visualisierung des Tumorwachstums nach intraperitonealer Injektion stabiler TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien in C57BL/6J RAG-2 Mäusen mittels IVIS. Wöchentliche Messung der Luminiszenz der Zellen der TE671-Zelllinie anti-NCAM Intrabody + Luziferase durch Injektion einer Luziferin-Lösung. IB: Intrabody. NCAM: Neutrales Zelladhäsionsmolekül.

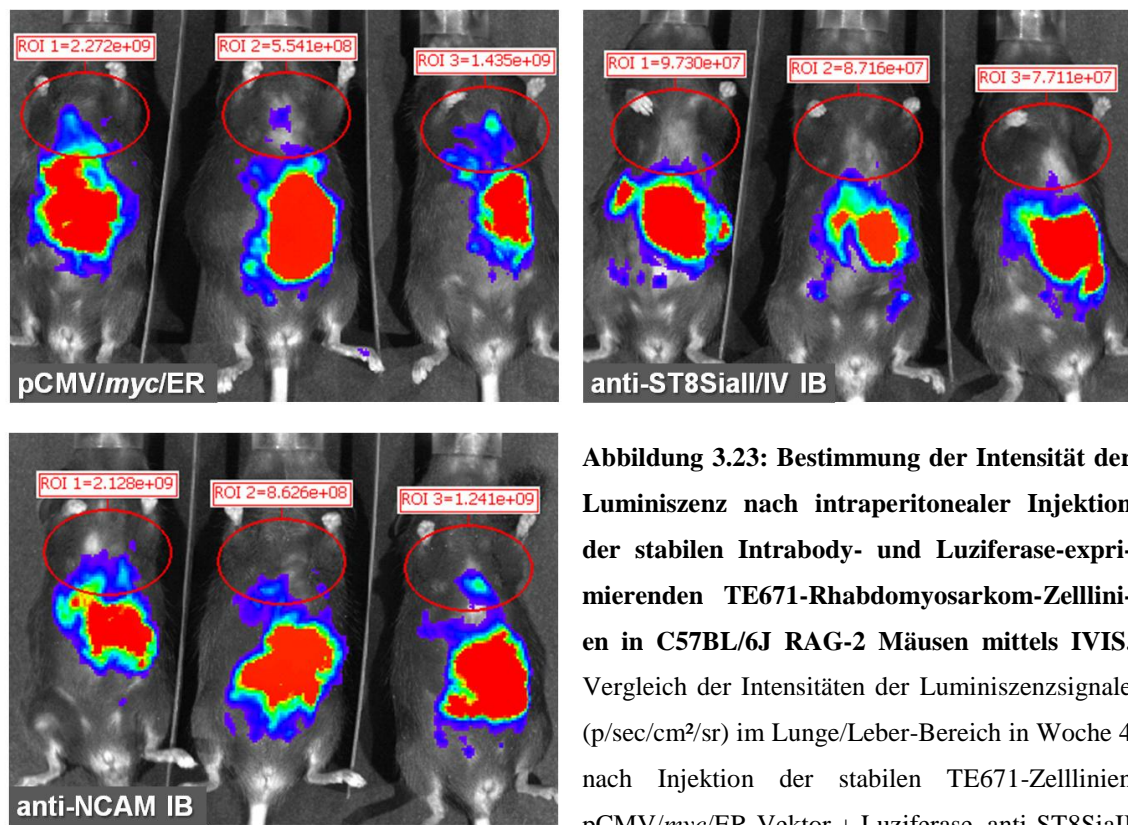


Abbildung 3.23: Bestimmung der Intensität der Lumineszenz nach intraperitonealer Injektion der stabilen Intrabody- und Luziferase-expressierenden TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien in C57BL/6J RAG-2 Mäusen mittels IVIS. Vergleich der Intensitäten der Lumineszenzsignale (p/sec/cm²/sr) im Lunge/Leber-Bereich in Woche 4 nach Injektion der stabilen TE671-Zelllinien pCMV/myc/ER-Vektor + Luziferase, anti-ST8SialII

Intrabody + anti-ST8SialIV Intrabody + Luziferase und anti-NCAM Intrabody + Luziferase. IB: Intrabody. NCAM: Neutrales Zelladhäsionsmolekül. ROI: *region of interest*.

4. Diskussion

4.1 Herstellung von Intrabodies aus der RNA von Hybridomazellen

Um Intrabodies aus der RNA von Hybridomazellen zu generieren, gibt es grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten. Die Hauptanforderung dabei ist, die Sequenzen der variablen Domänen der Antikörper zu bestimmen und zu einer scFv-Sequenz zu kombinieren. Die Expression als ER-Intrabody erfordert dann nur noch die Klonierung der scFv-Sequenz in den Vektor pCMV/*myc*/ER. In der Gruppe von Dr. Thomas Böldicke kamen dafür in der Vergangenheit Konsensus-Primer für die Amplifikation der variablen Domänen eines Antikörpers zum Einsatz (Pope *et al.*, 1996). Dies führte aber nicht in jedem Fall zum Erfolg und garantiert auch nicht, dass die amplifizierten Sequenzen an ihren Enden noch mit den originalen übereinstimmen, wodurch es unter Umständen zu einer veränderten Bindungsaffinität kommen kann. Eine andere Methode besteht in der Anwendung von Primer-Banken, bei denen eine ganze Palette an spezifischen Primern für bekannte Sequenzanfänge und -enden der variablen Domänen zum Einsatz kommen, mit deren Hilfe die einzelnen variablen Domänen dann unabhängig vom Isotyp des Antikörpers amplifiziert werden können (Nam *et al.*, 2002). In diesem Fall sind aber viele Amplifikationsansätze nötig und die Gefahr von *mismatches* und damit veränderten Sequenzen besteht weiterhin. Durch stetige Weiterentwicklung und Optimierung der entsprechenden Primer und Primermischungen werden diese Nachteile aber nach und nach verringert (Hust *et al.*, 2012).

Für diese Arbeit wurde ein Verfahren benutzt, welches zunächst die Originalsequenzen der variablen Domänen der Antikörper liefert, um mit Hilfe dieser Sequenzen spezifische Primer für die Amplifikation der variablen Domänen zu generieren (Ladiges und Osman, 2000). Aus der RNA der Hybridomazellen (Abb. 3.2) wurden doppelsträngige cDNA-Fragmente generiert, welche dann mit einem Adapter-Fragment versehen wurden. So wurde es ermöglicht, mit der bereits bekannten Information über den Isotyp des jeweiligen Antikörpers Primer für die konservierten konstanten Domänen und für das Adapter-Fragment zu generieren (Abb. 3.3). Eine anschließende Sequenzierung der Amplifikate lieferte dann die Sequenzen der variablen Domänen. Daraufhin konnten spezifische Primer für die variablen Domänen und eine *linker*-Sequenz, die mit dem Anfang von V_L und dem Ende von V_H überlappt, generiert (Abb.

3.5) sowie der scFv in einer *assembly*-PCR (Abb. 3.6; Pope *et al.*, 1996) zusammengefügt werden. Das Verfahren erwies sich insgesamt als zuverlässig und mit geringem Aufwand reproduzierbar (Abb. 3.1 und 3.4; Böldicke *et al.*, 2012). In der Immunfluoreszenz (Abb. 3.7) und im Immunblot (Abb. 3.8) waren die in HEK293-Zellen exprimierten Intrabodies über das myc-Tag detektierbar und zeigten einerseits ein ER-Expressionsmuster sowie die erwartete Größe von ca. 30 kDa, sodass von einer erfolgreichen Herstellung der Intrabodies ausgegangen werden konnte.

4.2 Charakterisierung der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV

4.2.1 Bindungsanalyse

In der Bindungsanalyse der Intrabodies gegen die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV zeigte sich die grundsätzliche Funktionalität des Ansatzes. Die Intrabodies waren sowohl im ELISA als auch in der Ko-Immunpräzipitation in der Lage, die Polysialyltransferasen zu binden, die Bindungskapazität der Originalantikörper blieb also erhalten. Darüber hinaus konnte in der Immunfluoreszenz die ER-Retention der Polysialyltransferasen durch die Intrabodies gezeigt werden.

Konnte im ELISA über die Qualität der Bindung noch keine Aussage getroffen werden, da hier nur mit einem Zelllysats von transient transfizierten Zellen mit unbekannter Intrabody-Konzentration gearbeitet wurde (Abb. 3.10), so zeigte sich in der Ko-Immunpräzipitation ein weitgehend gleiches Bild wie in der Immunpräzipitation der Polysialyltransferasen allein (Abb. 3.11). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Präzipitation über die Intrabodies ähnlich effektiv funktioniert wie über das HA-Tag der Polysialyltransferasen. Diese zeigten im Immunblot eine Vielzahl an detektierten Banden, die sich mit dem Erscheinungsbild der mit FLAG- und HA-Tag versehenen Polysialyltransferasen bei ihrer früheren Verwendung decken (Windfuhr *et al.*, 2000; Mühlenhoff *et al.*, 2001). Dabei entsprechen die verschiedenen Banden den unterschiedlichen Glykosylierungsformen der Proteine: ST8SiaII weist sechs, ST8SiaIV dagegen fünf N-Glykosylierungsstellen auf, wobei sich die Größe des Proteins pro Glykosylierung um ca. 3 kDa verändert. Die Proteinformen, die im Gel die kürzeste

Wegstrecke migrierten, entsprechen daher der vollständig glykolisierten (60 kDa ST8SiaII, 55 kDa ST8SiaIV), die am weitesten migrierten der nicht glykolisierten Form (45 kDa ST8SiaII, 44 kDa ST8SiaIV) der Polysialyltransferasen (Mühlenhoff *et al.*, 2001). In dem Versuch wurden HEK293-Zellen transient mit den Expressionsplasmiden der Polysialyltransferasen transfiziert und nicht die stabilen CHO-Zelllinien verwendet, die bei der folgenden Funktionsanalyse zum Einsatz kamen und jeweils eine der Transferasen exprimieren. Dies lag zum einen daran, dass sich die Detektion der Polysialyltransferasen im Immunblot bei den stabilen Linien trotz der angenommenen Überexpression als schwierig zu bewerkstelligen erwies. Zum anderen konnte so die Vergleichbarkeit der präzipitierten Proteinmenge gewährleistet werden, da sich die Transfektionsraten der Kotransfektion und der alleinigen Transfektion der Polysialyltransferasen-Expressionsplasmide auf einem ähnlichem Niveau bewegten.

In der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die Intrabodies und die Polysialyltransferasen im ER bzw. im Golgi-Apparat exprimiert wurden, da eine Kolokalisation mit dem ER-Marker Calnexin und dem Golgi-Marker α -Mannosidase II vorlag (Abb. 3.12). Wurde nun der entsprechende Intrabody in einer der stabilen CHO-Zelllinien exprimiert, verlagerte sich das Signal für die Polysialyltransferasen vom Golgi-Apparat in das ER und lag mit dem Intrabody kolokalisiert vor (Abb. 3.13). In der Negativkontrolle mit dem jeweils anderen Intrabody blieb das Signal für die Polysialyltransferase dagegen im Golgi-Apparat enthalten. Dabei ist zu bemerken, dass die Anfärbung des Calnexins qualitativ gegenüber der des Intrabody zurückfiel, da es weniger gut verteilt und grobkörnig auftrat. Trotzdem kann aufgrund der Überlagerung der Bilder aber von einer Kolokalisation ausgegangen werden, insbesondere im Vergleich zu anderen Arbeiten über Intrabodies (zum Beispiel anti-TLR2 Intrabody; Kirschning *et al.*, 2010). Ähnliches gilt für den Golgi-Apparat, dessen Struktur nach der Färbung nicht gut erhalten war, sodass dessen sichere Identifikation nur über die Anfärbung des Markers erfolgen konnte.

Die Charakterisierung und Funktionalität des anti-NCAM Intrabody wurde bereits in einer früheren Arbeit gezeigt (Böldicke *et al.*, 2012). Zusätzlich sollte aber, analog zu den Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Polysialyltransferasen, die ER-Retention des NCAM gezeigt werden (Abb. 3.17). Dabei ließ sich feststellen, dass sich das NCAM bei Einsatz des Intrabody im ER sammelt, während es in der Negativkontrolle weiter auf

der Zelloberfläche exprimiert wird. Hier war die immunologische Färbung des NCAM an der Zelloberfläche auch bei permeabilisierter Zellmembran möglich, was im Fall der Polysialinsäure jedoch nicht funktionierte und demzufolge auch nicht gezeigt werden konnte.

4.2.2 Funktionsanalyse

Die reduzierte Expression von polysialyliertem NCAM nach Expression der Intrabodies und damit das eigentliche Ziel ihrer Herstellung konnte neben der Bindung und der ER-Retention der Polysialyltransferasen ebenfalls nachgewiesen werden. Die Analysen wurden mittels Durchflusszytometrie und Immunblot durchgeführt. In einem vorab durchgeführten Experiment wurde per Immunpräzipitation ermittelt, wie lange die Intrabodies in den Zellen nach transienter Transfektion in einer ausreichenden Menge exprimiert werden (Abb. 3.14). Dieser Zeitraum musste so lang wie möglich ausfallen und wurde entsprechend der Ergebnisse auf sechs Tage festgelegt, da ein inhibierender Effekt der Intrabodies erst nach dem natürlichen Proteinabbau der noch im Golgi-Apparat aktiven Polysialyltransferasen als auch des polysialylierten NCAM an der Zelloberfläche zu erwarten war.

In der Durchflusszytometrie zeigte sich neben dem erfolgreichen Einsatz der spezifischen Intrabodies auch ein leichter Einfluss der Negativkontrollen auf die Polysialylierung in Form des jeweils anderen Intrabodies (Abb. 3.15). Gleiches zeigte sich aber auch im Immunblot mit dem leeren Vektor pCMV/*myc*/ER (Abb. 3.16). Dadurch, und weil die Antikörper gegen die Polysialyltransferasen keine Kreuzreaktion aufweisen, konnte ein möglicher Einfluss des jeweils inkorrekten Intrabody jedoch ausgeschlossen werden. Letztlich konnte die Beobachtung experimentell nicht aufgeklärt werden, doch lässt sich spekulieren, dass es sich dabei eventuell um einen ähnlichen Effekt wie bei der sogenannten transkriptionellen Interferenz handelt. Dabei kann ein Promoter, der einem anderen vorgeschaltet wurde, die für die Transkription nötigen Faktoren und Polymerasen binden, sodass die Transkription über den eigentlichen Promoter gestört wird (Greger *et al.*, 2000; Conte *et al.*, 2002). In allen Funktionsanalysen wurden stabile CHO-Zelllinien verwendet, bei denen die Transkription der Polysialyltransferasen über einen CMV-Promoter erfolgt (Mühlenhoff *et al.*, 2001). Zusätzlich erwies sich die Expression der Polysialyltransferasen in diesen

Zelllinien schon im Immunblot bei der Bindungsanalyse als relativ gering (4.2.1). Grundsätzlich wäre es daher denkbar, dass die transiente Transfektion mit einem ebenfalls CMV-Promoter gesteuerten und in hoher Anzahl in den Zellen vorliegenden Expressionsplasmid hier zu einer negativen Beeinflussung der Transkriptionsrate der Polysialyltransferasen führt. Unterstützt wurde dies durch die Tatsache, dass die später verwendeten TE671-Zellen keinen solchen Effekt mehr aufwiesen.

Eine weitere Auffälligkeit in der Durchflusszytometrie betrifft die Anwesenheit von zwei Höchstwerten in der Messung der Polysialinsäure auf der Zelloberfläche von stabilen CHO-Zelllinien (Abb. 3.15). Im Normalfall zeigt die Messung eines Oberflächenantigens nur einen Intensitätshöhepunkt, sodass zwei Höhepunkte eher auf die Mischung von verschiedenen Zellpopulationen hinweisen. Eine Vermischung konnte aber einerseits durch die Kultivierung erneut aufgetauter Zellen und andererseits durch Vereinzelung der Zellen und erneutem Selektionsdruck durch Zugabe von Antibiotikum in das Zellkulturmedium ausgeschlossen werden. In den später verwendeten TE671-Zellen war ein ähnlicher Effekt nicht mehr zu beobachten, sodass er auch nicht als charakteristisch für die Messung von Polysialinsäure gelten kann. Letztlich konnte die genaue Ursache für die zwei Intensitätshöhepunkte in den stabilen CHO-Zelllinien nicht aufgeklärt werden. Die Beobachtung hatte aber auch keinen Einfluss auf die Relevanz der erzielten Ergebnisse.

Im Immunblot zeigte sich neben der Abnahme der Polysialinsäure im Zelllysate auch die gleichzeitige Zunahme an detektierbarem NCAM (Abb. 3.16). Diese Korrelation ergibt sich aus der Tatsache, dass polysialyliertes NCAM größtenteils nur noch im hochmolekularen Bereich nachzuweisen ist, da die Polysialinsäure einen erheblichen Teil der Molekülmasse ausmacht. Da die Ketten der Polysialinsäure in unterschiedlicher Anzahl und Länge auftreten können (Galuska *et al.*, 2006; Galuska *et al.*, 2008) und das NCAM auf diese Weise einhüllen, ist eine Detektion von polysialyliertem NCAM mit einem anti-NCAM Antikörper meist entweder kaum oder nur als Signal über einen größeren Bereich statt als definierte Bande möglich. Wird die Polysialinsäure dann entfernt, nimmt die Intensität des Signals für die NCAM-Isoformen mit 120, 140 und 180 kDa (je nach Expression in der entsprechenden Zelllinie) zu. Im Fall der verwendeten stabilen CHO-Zelllinien wäre für die unbehandelten Zellen und die Negativkontrolle eigentlich ein noch wesentlich schwächeres Signal für die Banden des

NCAM bei 140 und 180 kDa zu erwarten gewesen. Hierbei könnte es sich um die gleiche Problematik wie die vorher diskutierte Anwesenheit von zwei Höchstwerten in der Durchflusszytometrie handeln. Dies beeinflusste aber auch in diesem Fall nicht die Ergebnisse bezüglich der Funktionalität der Intrabodies.

Bis zu diesem Punkt der Arbeit ließ sich in der Durchflusszytometrie und im Immunblot eine nur teilweise reduzierte Expression von polysialyliertem NCAM feststellen (Abb. 3.15 und 3.16). Diese Beobachtung stand aber im Einklang mit der transienten Transfektion der verwendeten Zellen, bei der durchschnittlich nur ca. 60-70 % der Zellen erfolgreich transfiziert wurden und so die Intrabodies exprimierten. Nach Generierung der stabilen TE671-Zelllinien zeigte sich jedoch, dass die reduzierte Expression von polysialyliertem NCAM auch hier nicht vollständig ausfiel, obwohl nun jede Zelle die Intrabodies exprimierte, wie die mikroskopischen Aufnahmen der Immunfluoreszenz zeigten (Abb. 3.18). Dies stand im Gegensatz zu der stabilen Zelllinie mit dem anti-NCAM Intrabody, bei der nahezu kein NCAM auf der Zelloberfläche mehr nachzuweisen war, sodass der Prozess der Herstellung der stabilen Linien als Grund dafür nicht in Frage kam. Auf der anderen Seite war die Reduzierung aber definitiv auf die Intrabodies zurückzuführen, wie der Vergleich mit der Kontrollzelllinie mit dem Vektor pCMV/myc/ER bewies. Daraufhin wurden weitere Experimente vorgenommen, die einige der möglichen Gründe für die nur teilweise reduzierte Expression von polysialyliertem NCAM ausschließen sollten (Abb. 3.19): Um als Ursache das Zusammenspiel beider Intrabodies in den TE671-Zellen auszuschließen, wurden CHO-C6-Zellen ebenfalls stabil transfiziert. Diese exprimieren im Gegensatz zu den TE671-Zellen nur die Polysialyltransferase ST8SiaIV, sodass hier der anti-ST8SiaIV Intrabody einzeln getestet werden konnte. Aber auch mit dieser Zelllinie zeigte sich in der Durchflusszytometrie ein ähnliches Resultat wie mit den TE671-Zellen, die beide Intrabodies exprimierten. Weiterhin wurde überprüft, ob es entgegen der Beobachtung, dass das NCAM und die Polysialyltransferasen erst im *trans*-Golgi-Netzwerk miteinander interagieren, bereits zu einer Bindung im ER kommen kann. Dies könnte dann dazu führen, dass die Intrabodies nicht mehr an die Polysialyltransferasen binden und so der Komplex aus NCAM und Polysialyltransferase ohne Retention im ER in den Golgi-Apparat gelangt. Im ELISA zeigte sich jedoch, dass auch bei einer Bindung von ST8SiaIV an das NCAM der entsprechende Antikörper eine unverminderte Bindung an die Polysialyltransferase aufweist, wie der Vergleich mit den

ELISA-Ergebnissen ohne das NCAM zeigt (Abb. 3.9). Zuletzt wurde überprüft, ob die Darstellung der Messung von Polysialinsäure in der Durchflusszytometrie einen falschen Eindruck vermittelt, da die Signalintensität hier logarithmisch dargestellt wird. Die stabile TE671-Zelllinie wurde daher zusammen mit der Kontrollzelllinie im Immunblot verwendet. Doch auch hier ließ sich im Vergleich zu den Kontrollen eine nur teilweise Reduzierung der Polysialinsäure feststellen, korrelierend mit nur teilweise depolysialyliertem NCAM.

Letztlich konnte die genaue Ursache für die nur teilweise reduzierte Polysialylierung des NCAM durch die Intrabodies in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Möglich wäre in diesem Zusammenhang, dass die Affinität der ursprünglichen Antikörper nicht ausreicht, um die Polysialyltransferasen vollständig im ER zurückzuhalten. Dagegen spricht aber, dass in den Immunfluoreszenz-Aufnahmen bei Einsatz der Intrabodies keine sichtbare Konzentration der Polysialyltransferasen im Golgi-Apparat zu erkennen war (Abb. 3.13). Weiterhin ist nicht vollständig auszuschließen, dass die Polysialyltransferasen trotz Bindung an die Intrabodies bei ihrem Weg durch das *cis*-Golgi-Netzwerk das NCAM polysialylieren können. Die Modifikation von N-Glykosylierungsstellen erfolgt aber erst im *trans*-Golgi-Netzwerk, und darüber hinaus erscheint es unwahrscheinlich, dass der gebundene Intrabody dabei keinen Effekt auf die Funktion der Polysialylierung aufweist. In diesem Zusammenhang wäre es auch denkbar, dass ER-Intrabodies gegen intrazelluläre oder speziell Golgi-residente Ziele schlechter funktionieren als gegen Oberflächenproteine, die bis jetzt die Hauptanwendung von ER-Intrabodies darstellen (vgl. auch Tab. 1.1) und bei denen zum Teil Phänotypen wie bei einem *knockout* erreicht werden können, wie es auch für den anti-NCAM Intrabody gezeigt werden konnte. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Messergebnisse generell verfälscht erscheinen, da die Anwesenheit von Polysialinsäure sowohl im Immunblot als auch in der Durchflusszytometrie nur über den anti-polySia 735 Antikörper bestimmt wurde (Frosch *et al.*, 1985). Dieser kann aufgrund der Gleichförmigkeit ihres Aufbaus mehrfach an die Ketten aus Polysialinsäure binden und berücksichtigt somit weder die Kettenlänge noch ihre Anzahl und kann in den Messergebnissen auch nicht differenzieren zwischen polysialiertem und nicht polysialyliertem NCAM. Daher könnten die Experimente auf eine höhere Menge an polysialyliertem NCAM hinweisen, als tatsächlich vorhanden war. Da aber im Immunblot der Einsatz des anti-NCAM ERIC-1 Antikörpers ebenfalls auf eine nicht

vollständige Reduzierung hinwies, ist auch dieser Grund als eher unwahrscheinlich zu betrachten (Abb. 3.19). Zuletzt wäre eine noch mögliche Ursache, dass in dieser Arbeit mit den Polysialyltransferasen ein Enzym als Antigen für die Intrabodies gewählt wurde. Da Intrabodies letztlich nur einen *knockdown* des entsprechenden Antigens bewirken, könnte auch eine geringe Menge an aktiven Polysialyltransferasen im Golgi-Apparat noch für genügend polysialyliertes NCAM an der Zelloberfläche sorgen.

4.3 *In vivo* Funktionsanalyse der Intrabodies gegen die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV

Für die Planung und Durchführung der Experimente *in vivo* wurde die Arbeit von Daniel *et al.* (2001) als Vorbild genommen. In dieser Arbeit wurde ermittelt, inwiefern humane TE671-Zellen des Rhabdomyosarkoms in immundefizienten Mäusen nach Injektionen an unterschiedlichen Orten des Organismus Metastasen entwickeln und ob diese durch regelmäßige Injektionen der Endosialidase Endo-N verhindert oder reduziert werden können. Als Injektionsorte wurden dabei das Peritoneum (intraperitoneal, i.p.), die Muskeln (intramuskulär, i.m.), die Subkutis (subkutan, *subcutaneous*, s.c.) und die Venen (intravenös, i.v.) gewählt. Es zeigte sich, dass sich nur bei i.p.-, i.m.- und i.v.-Injektionen überhaupt Metastasen entwickeln und bei i.p.-Injektionen neben der Lunge auch die Leber betroffen ist. Endo-N wurde in regelmäßigen Abständen (zweimal die Woche) in das Peritoneum injiziert, um einen Effekt auf die Metastasierungsfähigkeit der i.p.-injizierten Zellen zu bestimmen. Als Kontrolle wurden i.m.-injizierte Zellen verwendet, da das Enzym bei intraperitonealer Injektion nicht in die Muskeln gelangt. Es stellte sich heraus, dass sich mit Endo-N die Metastasierung bei i.p.- im Gegensatz zu i.m.-Injektionen sowohl in der Lunge als auch in der Leber in 25 % der Versuchstiere verhindern ließ.

In dieser Arbeit wurden C57BL/6J RAG-2 Mäuse verwendet, die keine Produktion von B- und T-Zellen sowie NK- und NKT-Zellen aufweisen, damit die TE671-Zellen nicht vom Immunsystem der Maus erkannt und eliminiert werden können. Bei Daniel *et al.* wurden dagegen Nacktmäuse verwendet, die vor den Versuchen bestrahlt wurden, um die Produktion von NK-Zellen vorübergehend zu verhindern. Es wurden analog zum Vorbild jeweils 10^6 Zellen i.p. injiziert, in diesem Fall aber die stabilen Zelllinien mit

den Intrabodies gegen die Polysialyltransferasen, dem leeren Vektor pCMV/*myc*/ER und dem anti-NCAM Intrabody. Die Verfolgung des Tumorwachstums und der Metastasierung erfolgte hier statt per Autopsie mittels wöchentlicher Messung der Luminiszenz der in den stabilen Zelllinien exprimierten Luziferase.

Bereits nach vier Wochen zeigten sich für die Kontrollzelllinien mit dem Vektor und dem anti-NCAM Intrabody neue Signale und damit Metastasen im Bereich der Lunge und der Leber (Abb. 3.23), wobei das jeweilige Organ durch die Messung im IVIS nicht genau bestimmt werden konnte. Nach fünf Wochen traten qualitativ vergleichbare Signale auch in den Mäusen mit der Zelllinie mit den Intrabodies gegen die Polysialyltransferasen auf. Nach sechs Wochen war ein Unterschied für die verschiedenen Zelllinien nicht mehr zu erkennen (Abb. 3.20-3.22). Unterschiedlich schnelles Wachstum der Zellen konnte durch den Proliferationsassay (Abb. 3.18) und durch das Erscheinungsbild im IVIS als Grund für das spätere Auftreten der Metastasierung ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu der Arbeit von Daniel *et al.* lassen die Ergebnisse also eher auf eine zeitliche Verzögerung der Metastasierung durch die reduzierte Expression von polysialyliertem NCAM schließen als auf eine komplette Inhibition. Allerdings ist hier zu bedenken, dass die Reduzierung der Expression von polysialyliertem NCAM in den stabilen Zelllinien nicht vollständig ausfiel (4.2.2). Wäre dies der Fall, so erscheint eine komplette Inhibition als durchaus möglich. Im Fall von Daniel *et al.* wurde das Auftreten von Metastasen trotz Behandlung mit Endo-N vor allem mit der schwankenden Wirkungsweise des Enzyms erklärt, bei der nicht immer alle Zellen durch Diffusion im Peritoneum erreicht werden können. Eine weitere Auffälligkeit in der vorliegenden Arbeit ist, dass es im Gegensatz zu Daniel *et al.* ausnahmslos in jedem Versuchstier zur Entwicklung eines Peritonealkarzinoms kam und ein sich innerhalb der drei Gruppen gleichender Verlauf der Erkrankung einstellte. Als letztes ist zu bemerken, dass der Vergleich der Zelllinie mit dem anti-NCAM Intrabody die Beobachtung bestätigt, dass fehlendes NCAM auf Tumorzellen die Metastasierung fördert, bzw. ein vergleichbares Niveau wie bei Zellen mit polysialyliertem NCAM erreicht (Sasaki *et al.*, 1998; Perl *et al.*, 1999; Huerta *et al.*, 2001).

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit generierten Intrabodies gegen die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV können sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für weitere Analysen genutzt werden. Abhängig ist dies jeweils vom verwendeten Zelltyp und der damit zusammenhängenden Effizienz des Gentransfers. Es wäre daher eine Alternative, die DNA der Intrabodies in einen viralen Vektor zu klonieren, um diese Effizienz zu erhöhen, so wie es in anderen Arbeiten über Intrabodies der Fall ist (zum Beispiel Kirschning *et al.*, 2010). Damit wäre es dann auch möglich, die Intrabodies in Mäusen anzuwenden, ohne von vorher generierten stabilen Zelllinien abhängig zu sein. Weiterhin könnten die beiden Intrabody-Gene auch in einem Konstrukt vereinigt sowie um einen Expressionsmarker wie GFP erweitert werden.

Eine Einschränkung der weiteren Nutzung der Intrabodies stellt die nur teilweise reduzierte Expression von polysialyliertem NCAM dar (4.2.2). In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, die Menge an Polysialinsäure, die vor und nach Anwendung der Intrabodies vorhanden ist, nicht über die immunologische Detektion mit dem anti-polySia 735 Antikörper zu bestimmen, sondern mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high-performance liquid chromatography*; HPLC) (Galuska *et al.*, 2006). Dies würde dazu beitragen, ihre tatsächliche Effizienz ermitteln zu können. Auf ähnliche Weise wäre es auch möglich, mittels HPLC die Aktivität der Polysialyltransferasen in Zelllysaten zu vergleichen (Keys *et al.*, 2012). So könnte ergründet werden, ob die Bindung der Intrabodies zu einer Inaktivierung der Transferasen führt. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch, ob die Anwendung von Intrabodies zu einer Veränderung der Polysialylierung bezogen auf die Anzahl und Länge der Polysialinsäureketten führt. Zuletzt bietet sich auch die Alternative an, weitere Intrabodies aus den ursprünglichen Antikörpern zu generieren oder neue Antikörper beispielsweise mittels Phagen-Display zu selektieren, um eine höhere Affinität der Intrabodies zu erreichen. Wenn die Reduzierung der Expression von polysialyliertem NCAM dadurch erhöht oder sogar, wie ursprünglich vorgesehen, nahezu vollständig ausfallen würde, wären die Intrabodies ein überaus nützliches Werkzeug in der Erforschung der Polysialylierung des NCAM.

Bezogen auf die Versuche *in vivo* könnten weitere Versuchsreihen unternommen werden, bei der nach vier Wochen und zu einem späteren Zeitpunkt eine Autopsie der Mäuse vorgenommen wird. So könnte das Auftreten von Metastasen wie bei Daniel *et al.* auch quantitativ bestimmt werden. Darüber hinaus würde es sich anbieten, die Vorgehensweisen beider Arbeiten zu kombinieren, also zusätzlich zu der Anwendung von Intrabodies auch regelmäßige Injektionen von Endo-N vorzunehmen. Wenn auf diese Weise die Metastasierung komplett verhindert oder ihr Auftreten weiter reduziert werden könnte, wäre dies im Hinblick auf einen medizinischen Nutzen sehr aufschlussreich. Es wäre dann erstrebenswert, die Therapie bei Diagnose eines Tumors mit Expression von polysialyliertem NCAM um einen Ansatz zur Depolysialylierung zu erweitern.

5. Zusammenfassung

Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) ist ein primär auf Zellen des Nervensystems exprimiertes Adhäsionsmolekül und ist am Aufbau des Nervensystems sowie der Gehirnentwicklung beteiligt. Darüber hinaus reguliert es die Plastizität von Geweben im adulten Organismus. Durch die in verschiedenen Entwicklungsstadien im Golgi-Apparat exprimierten Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV kann das NCAM auf einzigartige Weise mit Polysialinsäure, einem Polymer der 5-*N*-Acetylneuraminsäure, modifiziert werden, was einerseits zu einer Umkehr der adhäsiven Eigenschaften und andererseits zu veränderten Interaktionsmöglichkeiten führt. Diese Funktion ist essentiell während der Embryogenese und wird bei einigen Tumorvarianten reaktiviert, wodurch deren Metastasierung gefördert wird.

Intrabodies sind intrazellulär exprimierte, rekombinante Antikörperfragmente und ermöglichen den *knockdown* ihres Zielantigens, indem es gebunden und die Translokation in sein natürliches Zellkompartiment verhindert wird. ER-Intrabodies werden im Endoplasmatischen Retikulum exprimiert und verankert und eignen sich damit besonders für Zelloberflächenantigene.

In dieser Arbeit wurden aus im Vorfeld generierten monoklonalen Antikörpern gegen die Polysialyltransferasen ER-Intrabodies hergestellt, welche die Polysialylierung des NCAM durch Retention der Transferasen im ER verhindern sollten. Als Ausgangsmaterial wurde die RNA aus Hybridomazellen verwendet, woraus die Sequenzen der jeweiligen variablen Domänen gewonnen wurden. Anschließend wurden diese per PCR zu einer scFv-Sequenz kombiniert und nach Klonierung in den Vektor pCMV/*myc*/ER als ER-Intrabodies exprimiert. Die Bindung der Intrabodies an die Polysialyltransferasen wurde durch ELISA und Immunpräzipitation überprüft und ihre Retention im ER mittels Immunfluoreszenz gezeigt. Die dadurch verminderte Expression von polysialyliertem NCAM auf der Zelloberfläche konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie und im Immunblot demonstriert werden. Im Anschluss an die Charakterisierung *in vitro* wurde die Funktionalität der Intrabodies *in vivo* getestet. Dazu wurden Zellen des Rhabdomyosarkoms stabil mit den Intrabodies sowie einer Luziferase transfiziert und in einem bereits etablierten Tumor-Mausmodell mittels IVIS hinsichtlich ihres Metastasierungspotentials untersucht und verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die durch den Einsatz der Intrabodies reduzierte Expression von polysialyliertem NCAM die Metastasierung verzögern kann.

6. Anhang

6.1 Klonierungsvektoren

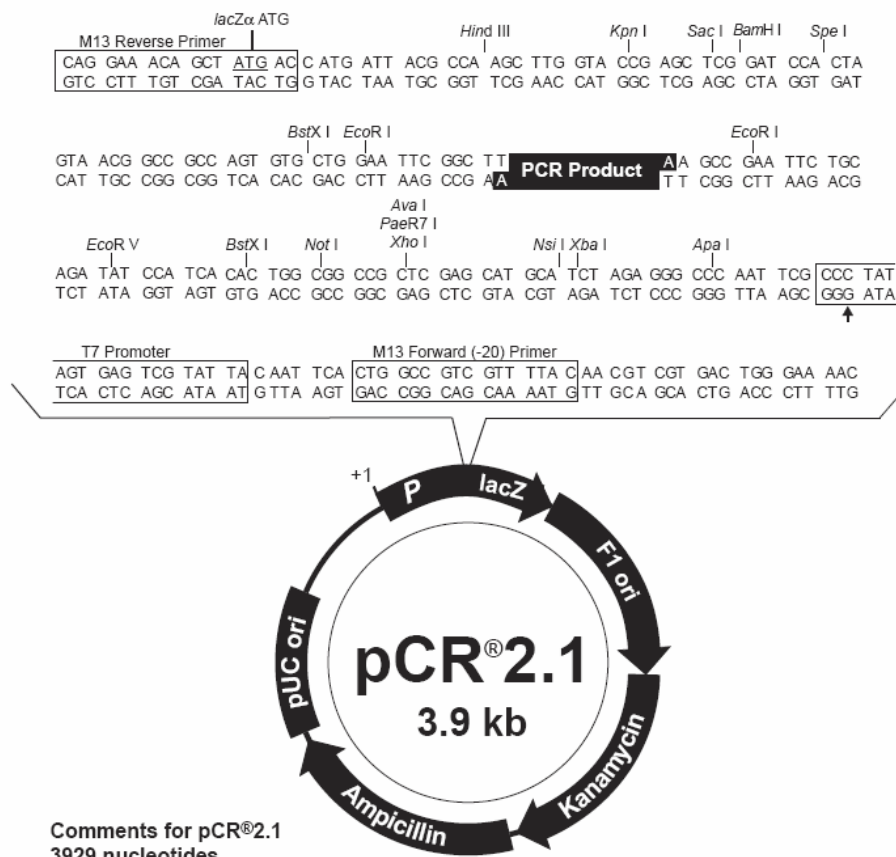


Abbildung 6.1: pCR2.1-Vektorkarte (Invitrogen)

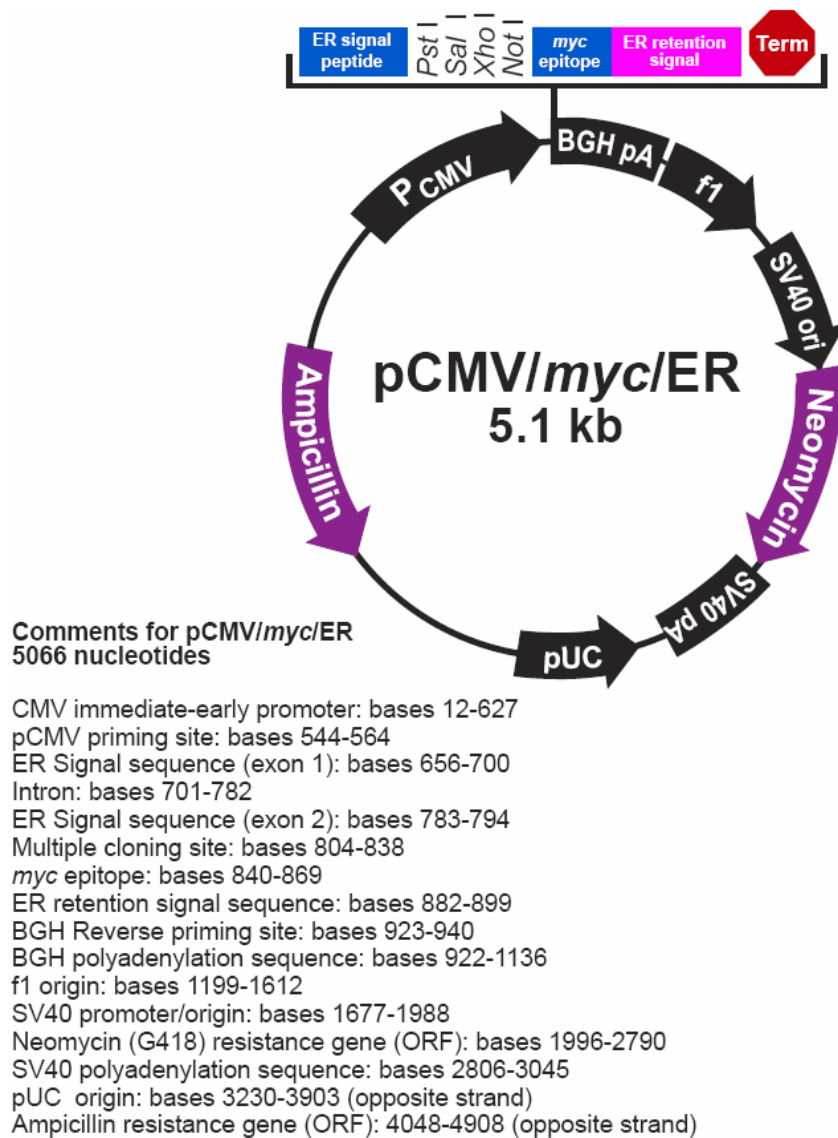


Abbildung 6.2: pCMV/myc/ER-Vektorkarte (Invitrogen)

6.2 Sequenzen der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies

| ER SIGNALPEPTID | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|----------------------|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | M | G | W | S | C | I | I | L | F | L | V | A | T | A | T |
| -160 | ATG | GGA | TGG | AGC | TGT | ATC | ATC | CTC | TTC | TTG | GTA | GCA | ACA | GCT | ACA |
| | INTRON | | | | G | A | H | S | Q | V | Q | L | Q | V | D |
| -121 | ... | ... | ... | ... | GGC | GCG | CAC | TCC | CAG | GTC | CAA | CTG | CAG | GTC | GAC |
| VH → | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Q | V | Q | L | Q | Q | P | G | A | E | L | V | K | A | G |
| 1 | CAG | GTC | CAA | CTG | CAG | CAG | CCT | GGG | GCT | GAG | CTT | GTG | AAG | GCT | GGG |
| | CDR1H | | | | | | | | | | | | | | |
| 46 | A | S | V | K | L | S | C | K | A | S | G | Y | T | F | T |
| | GCT | TCA | GTG | AAA | CTG | TCC | TGC | AAG | GCT | TCT | GGC | TAC | ACC | TTC | ACC |
| | N | Y | W | M | H | W | V | K | Q | R | P | G | Q | G | L |
| 91 | AAC | TAC | TGG | ATG | CAC | TGG | GTG | AAA | CAG | AGG | CCT | GGA | CAA | GGC | CTT |
| | CDR2H | | | | | | | | | | | | | | |
| | E | W | I | G | E | I | D | P | S | E | S | Y | T | N | Y |
| 136 | GAG | TGG | ATC | GGA | GAG | ATT | GAT | CCT | TCT | GAA | AGC | TAT | ACT | AAC | TAC |
| | N | Q | K | F | K | G | K | A | T | L | T | V | D | K | S |
| 181 | AAT | CAA | AAG | TTC | AAG | GGC | AAG | GCC | ACA | TTG | ACT | GTA | GAC | AAA | TCC |
| | A | S | T | A | Y | M | Q | L | S | S | L | T | S | E | D |
| 226 | GCC | AGC | ACA | GCC | TAC | ATG | CAG | CTC | AGC | AGC | CTG | ACA | TCT | GAG | GAC |
| | CDR3H | | | | | | | | | | | | | | |
| | S | A | V | Y | Y | C | T | R | G | D | Y | W | G | Q | G |
| 271 | TCT | GCG | GTC | TAT | TAC | TGT | ACA | AGG | GGG | GAC | TAC | TGG | GGC | CAA | GGC |
| | LINKER → | | | | | | | | | | | | | | |
| | T | T | L | T | V | S | S | G | G | G | G | S | G | G | G |
| 316 | ACC | ACT | CTC | ACA | GTC | TCC | TCA | GGT | GGA | GGC | GGT | TCA | GGC | GGA | GGT |
| | VL → | | | | | | | | | | | | | | |
| | G | S | G | G | G | G | S | D | V | V | V | T | Q | T | P |
| 361 | GGC | TCT | GGC | GGT | GGC | GGA | TCG | GAT | GTT | GTG | GTG | ACT | CAA | ACT | CCA |
| | L | S | L | P | V | S | F | G | D | Q | V | S | I | S | C |
| 406 | CTC | TCC | CTG | CCT | GTC | AGC | TTT | GGA | GAT | CAA | GTT | TCT | ATC | TCT | TGC |
| | CDR1L | | | | | | | | | | | | | | |
| | R | S | S | Q | S | L | A | N | S | Y | G | N | T | Y | L |
| 451 | AGG | TCT | AGT | CAG | AGT | CTT | GCA | AAC | AGT | TAT | GGG | AAC | ACC | TAT | TTG |
| | S | W | Y | L | H | K | P | G | Q | S | P | Q | L | L | I |
| 496 | TCT | TGG | TAC | CTG | CAC | AAG | CCT | GGC | CAG | TCT | CCA | CAG | CTC | CTC | ATC |
| | CDR2L | | | | | | | | | | | | | | |
| | Y | G | I | S | N | R | F | S | G | V | P | D | R | F | S |
| 541 | TAT | GGG | ATT | TCC | AAC | AGA | TTT | TCT | GGG | GTG | CCA | GAC | AGG | TTC | AGT |
| | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | K | I | S | T | I |
| 586 | GGC | AGT | GGT | TCA | GGG | ACA | GAT | TTC | ACG | CTC | AAG | ATC | AGC | ACA | ATA |
| | CDR3L | | | | | | | | | | | | | | |
| | K | P | E | D | L | G | I | Y | Y | C | L | Q | G | A | H |
| 631 | AAG | CCT | GAG | GAC | TTG | GGA | ATA | TAT | TAC | TGC | TTG | CAA | GGT | GCA | CAT |
| | Q | P | W | T | F | G | G | G | T | K | L | E | I | K | R |
| 676 | CAG | CCG | TGG | ACG | TTC | GGT | GGA | GGC | ACC | AAG | CTG | GAA | ATC | AAA | CGG |
| | NotI | | | | MYC-EPITOP | | | | | | | | | | |
| | A | A | A | E | Q | K | L | I | S | E | E | D | L | N | G |
| 721 | GCG | GCC | GCA | GAA | CAA | AAA | CTC | ATC | TCA | GAA | GAG | GAT | CTG | AAT | GGG |
| | ER RETENTIONSSEQUENZ | | | | | | | | | | | | | | |
| | A | A | S | E | K | D | E | L | | | | | | | |
| 766 | GCC | GCA | AGC | GAG | AAG | GAC | GAG | CTG | | | | | | | |

Abbildung 6.3: Basen- und Aminosäuresequenz des anti-ST8SiaII Intrabody (STX3167)

| ER SIGNALPEPTID | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|
| | M | G | W | S | C | I | I | L | F | L | V | A | T |
| -160 | ATG | GGA | TGG | AGC | TGT | ATC | ATC | CTC | TTC | TTG | GTA | GCA | ACA |
| | | | | | | | | | | | SaI | | |
| | INTRON | | | | G | A | H | S | Q | V | Q | L | Q |
| -121 | ... | ... | ... | ... | GGC | GCG | CAC | TCC | CAG | GTC | CAA | CTG | CAG |
| | VH → | | | | | | | | | | | | |
| | E | V | Q | L | Q | Q | S | G | A | E | L | V | R |
| 1 | GAG | GTT | CAG | CTG | CAG | CAG | TCT | GGG | GCA | GAG | CTT | GTG | AGG |
| | A | S | V | K | L | S | C | T | T | S | G | F | N |
| 46 | GCC | TCA | GTC | AAG | TTG | TCC | TGC | ACA | ACT | TCT | GGC | TTC | AAC |
| | CDR1H | | | | | | | | | | | | |
| | D | Y | Y | M | H | W | V | K | Q | R | P | E | Q |
| 91 | GAC | TAC | TAT | ATG | CAC | TGG | GTG | AAG | CAG | AGG | CCT | GAA | CAG |
| | CDR2H | | | | | | | | | | | | |
| | E | W | I | G | W | I | D | P | E | N | G | D | T |
| 136 | GAG | TGG | ATT | GGA | TGG | ATT | GAT | CCT | GAG | AAT | GGT | GAT | ACT |
| | A | P | K | F | Q | G | K | A | T | M | T | A | D |
| 181 | GCC | CCG | AAG | TTC | CAG | GGC | AAG | GCC | ACT | ATG | ACT | GCA | GAC |
| | S | N | T | A | Y | L | Q | L | S | S | L | T | S |
| 226 | TCC | AAC | ACA | GCC | TAC | CTG | CAG | CTC | AGC | AGC | CTG | ACA | TCT |
| | CDR3H | | | | | | | | | | | | |
| | T | A | V | Y | Y | C | N | Y | R | F | L | A | M |
| 271 | ACT | GCC | GTC | TAT | TAC | TGT | AAT | TAT | AGG | TTC | CTG | GCT | ATG |
| | LINKER → | | | | | | | | | | | | |
| | W | G | Q | G | T | S | V | T | V | S | S | G | G |
| 316 | TGG | GGT | CAA | GGA | ACC | TCA | GTC | ACC | GTC | TCC | TCA | GTC | ACT |
| | VL → | | | | | | | | | | | N | I |
| | S | G | G | G | G | S | G | G | G | G | S | M | M |
| 361 | GCA | GCC | GGT | GGA | GGC | GGT | TCA | GGC | GGA | GGT | GGC | AAC | ATT |
| | T | Q | S | P | S | S | L | A | V | S | A | G | E |
| 406 | ACA | CAG | TCG | CCA | TCA | TCT | CTG | GCT | GTG | TCT | GCA | GGA | GAA |
| | T | M | S | C | K | S | S | Q | S | V | L | Y | T |
| 451 | ACT | ATG | AGC | TGT | AAG | TCC | AGT | CAA | AGT | GTT | TTA | TAC | ACT |
| | CDR1L | | | | | | | | | | | | |
| | Q | K | N | Y | L | A | W | Y | Q | Q | K | P | G |
| 496 | CAG | AAG | AAC | TAC | TTG | GCC | TGG | TAC | CAG | CAG | AAA | CCA | GGG |
| | CDR2L | | | | | | | | | | | | |
| | P | K | L | L | I | Y | W | A | S | T | R | E | S |
| 541 | CCT | AAA | CTG | CTG | ATC | TAC | TGG | GCA | TCC | ACT | AGG | GAA | TCT |
| | P | D | R | F | T | G | S | G | S | G | T | D | F |
| 586 | CCT | GAT | CGC | TTC | ACA | GGC | AGT | GGA | TCT | GGG | ACA | GAT | TTT |
| | T | I | S | S | V | Q | A | E | D | L | A | V | Y |
| 631 | ACC | ATC | AGC | AGT | GTA | CAA | GCT | GAA | GAC | CTG | GCA | GTT | TAT |
| | CDR3L | | | | | | | | | | | | |
| | H | Q | Y | L | S | S | Y | T | F | G | G | G | T |
| 676 | CAT | CAA | TAC | CTC | TCC | TCG | TAC | ACG | TTC | GGA | GGG | GGG | ACC |
| | NotI | | | | | MYC-EPITOP | | | | | | | |
| | E | I | K | R | A | A | A | E | Q | K | L | I | S |
| 721 | GAA | ATA | AAA | CGG | GCG | GCC | GCA | GAA | CAA | AAA | CTC | ATC | TCA |
| | ER RETENTIONSSEQUENZ | | | | | | | | | | | | |
| | D | L | N | G | A | A | S | E | K | D | E | L | |
| 766 | GAT | CTG | AAT | GGG | GCC | GCA | AGC | GAG | AAG | GAC | GAG | CTG | |

Abbildung 6.4: Basen- und Aminosäuresequenz des anti-ST8SiaIV Intrabody (PST3175)

6.3 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| α FR | Alpha Folat-Rezeptor |
| A | Adenin |
| <i>Aat</i> | <i>Acetobacter aceti</i> |
| A-beta | Beta-Amyloid Protein |
| AIDS | Erworbenes Immundefektsyndrom (<i>acquired immune deficiency syndrome</i>) |
| apoB | Apolipoprotein B |
| APP | Beta-Amyloid Vorläuferprotein (<i>beta-amyloid precursor protein</i>) |
| APS | Ammoniumperoxidisulfat |
| Asn | Asparagin |
| BALB/c | <i>Bagg albino</i> / genotype of the "color" locus: <i>c/c</i> |
| B-Lymphozyt | <i>Bursa fabricii</i> -Lymphozyt (<i>bone marrow lymphocyte</i>) |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| BVEC | Endotheliale Blutgefäßzellen (<i>blood vessel endothelial cells</i>) |
| B-Zelle | <i>Bursa fabricii</i> -Lymphozyt (<i>bone marrow lymphocyte</i>) |
| C | Cytosin |
| C | Kohlenstoff (<i>carbon</i>) |
| C57BL/6J | <i>cross 57 black</i> / substrain 6 Jackson Laboratory |
| CAM | Zelladhäsionsmolekül (<i>cell adhesion molecule</i>) |
| CCR5 | CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5 |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>) |
| CDR | Komplementarität-bestimmende Region (<i>complementarity determining region</i>) |
| CGN | <i>cis</i> -Golgi-Netzwerk |
| C _H | Konstante Domäne der schweren Kette (<i>constant heavy</i>) |
| CHO-Zellen | Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (<i>chinese hamster ovary cells</i>) |
| C _L | Konstante Domäne der leichten Kette (<i>constant light</i>) |
| CMV | Cytomegalievirus |
| c-myc | Myelocytomatose |
| C-Terminus | Carboxy-(COOH)-Terminus |
| CXCR4 | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 |
| Cy | Cyanin |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |

| | |
|----------------|---|
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| ds | Doppelsträngig |
| DSMZ | Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| E-Cadherin | Endotheliales Cadherin |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFR | Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>) |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| EMT | Epithelial-mesenchymale Transition |
| Endo-N | Endo-N-Acylneuraminidase; Endoneuraminidase N |
| Endo-NF | Endo-N aus dem Bakteriophagen K1F |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ErbB-2 | Erythroblastose Homolog B2 |
| E-Selektin | Endotheliales Selektin |
| EZD | Extrazelluläre Domäne |
| Fab | Antigen-bindendes Fragment (<i>Fragment antigen binding</i>) |
| Fc | Kristallisierbares Fragment (<i>Fragment crystallizable</i>) |
| FCS | Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FGFR | Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor (<i>fibroblast growth factor receptor</i>) |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| FN | Fibronektin |
| Fv | Variables Fragment (<i>Fragment variable</i>) |
| G | Guanin |
| Gal | Galaktose |
| GDNF | <i>glial cell-derived neurotrophic factor</i> |
| GFL | Liganden der GDNF-Familie (<i>GDNF family of ligands</i>) |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GlcNAc | N-Acetylglucosamin |
| Gly | Glycin |
| gp | Glykoprotein |
| GPI | Glykosylphosphatidylinositol |
| H | Wasserstoff (<i>hydrogen</i>) |
| HA | Hämagglutinin |
| HBsAg | Hepatitis-B Oberflächenantigen (<i>hepatitis B surface antigen</i>) |
| HBV | Hepatitis-B-Virus |
| HCV | Hepatitis-C-Virus |
| HEBS | HEPES-gepufferte Salzlösung (<i>HEPES buffered saline</i>) |
| HEK-Zellen | Humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>) |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| hERD2 | Humaner KDEL-ER-Protein-Retentionsrezeptor 2 (<i>early-responsive to dehydration 2</i>) |

| | |
|------------|--|
| HIV | Humanes Immunschwächevirus |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>) |
| HRP | Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| HZI | Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung |
| i.m. | Intramuskulär |
| i.p. | Intraperitoneal |
| i.v. | Intravenös |
| IB | Intrabody |
| Ig | Immunglobulin |
| IgSF | Immunglobulin-Superfamilie |
| ImB | Immunblot |
| ImP | Immunpräzipitation |
| Intrabody | Intrazellulärer Antikörper (<i>intracellular antibody</i>) |
| IP | Immunpräzipitation |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| IVIS | <i>in vivo imaging system</i> |
| IZD | Intrazelluläre Domäne |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| KDEL | Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin |
| KDN | Ketodesoxyonulonsäure |
| Ko-IP | Ko-Immunpräzipitation |
| LB | <i>Lysogeny broth</i> |
| L-Motiv | Langes Sialylmotiv (<i>sialylmotif long</i>) |
| L-Selektin | Leukozyten-Selektin |
| luc | Luziferase (<i>luciferase</i>) |
| M | Molekularmarker |
| Man | Mannose |
| MET | Mesenchymal-epitheliale Transition |
| MHC I | Haupthistokompatibilitätskomplex I (<i>major histocompatibility complex I</i>) |
| MHH | Medizinische Hochschule Hannover |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| MOPS | 3(<i>N</i> -Morpholino)-Propansulfonsäure |
| mRNA | Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>) |
| MVV | Maedi-Visna-Virus |
| myc | Myelocytomatose |
| N | Stickstoff (<i>nitrogen</i>) |
| N-Cadherin | Neuronales / neuroendokrines Cadherin |
| NCAM | Neurales Zelladhäsionsmolekül (<i>neural cell adhesion molecule</i>) |
| Neu5Ac | 5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure |
| Neu5Gc | 5- <i>N</i> -Glycolyneuraminsäure |

| | |
|---------------------------|---|
| NKT-Zellen | Natürliche Killer-T-Zellen |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| <i>Not</i> | <i>Nocardia otitidis-caviarum</i> |
| N-Terminus | Amino-(NH ₂)-Terminus |
| O | Sauerstoff (<i>oxygen</i>) |
| P | Phosphat |
| p | Plasmid |
| p/sec/cm ² /sr | Photonen pro Sekunde pro Quadratcentimeter pro Steradian (<i>photons per second per centimeter squared per steradian</i>) |
| p75NTR | p75 Neurotrophin-Rezeptor |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) |
| PBST | PBS mit Tween 20 |
| P-Cadherin | Plazentales Cadherin |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| pd(N) | Poly-Desoxyribose mit zufälliger Nukleinbase |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| polySia | Polysialinsäure |
| PrPC | Zelluläres Prionprotein (<i>cellular prion protein</i>) |
| PSD | Postsynaptische Dichte |
| P-Selektin | Plättchen-Selektin |
| PST | Polysialyltransferase |
| PST-1 | Polysialyltransferase-1 |
| puro | Puromycin |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RAG-2 | Rekombination-aktivierendes Gen 2 |
| Ras | Rattensarkom |
| R-Cadherin | Retinales Cadherin |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| ROI | <i>region of interest</i> |
| RPE | Rhodophyta-Phycoerythrin |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase PCR |
| S | Svedberg |
| s.c. | Subkutan (<i>subcutaneous</i>) |
| <i>Sal</i> | <i>Streptomyces albus</i> |
| scFv | Einzelkettenantikörper (<i>single chain Fragment variable</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SEKDEL | Serin-Glutaminsäure-Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin |

| | |
|----------------|--|
| Ser | Serin |
| siRNA | <i>Small interfering ribonucleid acid</i> |
| S-Motiv | Kurzes Sialylmotiv (<i>sialylmotif short</i>) |
| SOB | <i>Super optimal broth</i> |
| ST8 | Alpha-N-Acetylneuraminat Alpha-2,8-Sialyltransferase / Sialyltransferase 8 |
| ST8SiaII | ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminide Alpha-2,8-Sialyltransferase 2 |
| ST8SiaIII | ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminide Alpha-2,8-Sialyltransferase 3 |
| ST8SiaIV | ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminide Alpha-2,8-Sialyltransferase 4 |
| STX | Sialyltransferase X |
| SV40 | Simian-Virus 40 |
| SynCAM 1 | Synaptisches Zelladhäsionsmolekül 1 (<i>synaptic cell adhesion molecule 1</i>) |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TAG-1 | Transient-axonales Glykoprotein 1 |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| Tat | Transaktivatorprotein |
| TEMED | <i>N, N, N', N'</i> ,-Tetramethylethylendiamin |
| TGN | <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk |
| Tie-2 | Tyrosinkinase mit Immunglobulin- und EGF-ähnlichen Domänen 2 |
| TLR2 | Toll-ähnlicher Rezeptor 2 (<i>toll-like receptor 2</i>) |
| T-Lymphozyt | Thymus-Lymphozyt |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TMD | Transmembrandomäne |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TRITC | Tetramethylrhodamin-isothiocyanat |
| T-Zelle | Thymus-Lymphozyt |
| ü.N. | Über Nacht |
| UV | Ultraviolett |
| VCAM-1 | Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>) |
| VE-Cadherin | Vaskulär-endotheliales Cadherin |
| VEGFR-2/KDR | Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2 (<i>vascular endothelial growth factor receptor 2 / kinase insert domain receptor</i>) |
| V _H | Variable Domäne der schweren Kette (<i>variable heavy</i>) |
| Vif | Viraler Infektivitätsfaktor |
| V _L | Variable Domäne der leichten Kette (<i>variable light</i>) |
| VLA-4 | <i>very late antigen-4</i> |
| VS-Motiv | Sehr kurzes Sialylmotiv (<i>sialylmotif very short</i>) |
| Xba | <i>Xanthomonas badrii</i> |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid |
| Zeo | Zeocin |

6.4 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1: Struktur des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) sowie dessen dominante Isoformen..... | 4 |
| Abbildung 1.2: Strukturformel eines Dimers der α 2-8-verknüpften Polysialinsäure (polySia) | 7 |
| Abbildung 1.3: Verschiedene Modelle für die Wirkungsweise des polysialylierten NCAM | 8 |
| Abbildung 1.4: Beispiel der Polysialinsäuresynthese an einem NCAM-Glykan..... | 10 |
| Abbildung 1.5: Eigenschaften eines Tumors | 15 |
| Abbildung 1.6: Metastasierung..... | 16 |
| Abbildung 1.7: Struktur eines Antikörpers sowie der rekombinanten Formen Fab und scFv | 19 |
| Abbildung 1.8: Struktur und Funktionsweise eines ER-Intrabody | 21 |
| Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Herstellung von Intrabodies aus Antikörper- produzierenden Hybridomazellen..... | 50 |
| Abbildung 3.2: Agarose-Gel der isolierten Gesamt-RNA aus Hybridomazellen | 51 |
| Abbildung 3.3: Präparative Agarose-Gele der PCR mit Primern für die konstante Domänen und das Adapter-Fragment der doppelsträngigen cDNA | 52 |
| Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Herstellung von Primern für die Amplifikation der DNA der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten der Antikörper sowie des <i>linker</i> -Fragments | 53 |
| Abbildung 3.5: Präparative Agarose-Gele der PCR mit spezifischen Primern für die DNA der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten der Antikörper sowie des <i>linker</i> -Fragments..... | 54 |
| Abbildung 3.6: Präparative Agarose-Gele der <i>assembly-PCR</i> der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV scFv-DNA..... | 55 |
| Abbildung 3.7: Expressionsanalyse der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV mittels Immunfluoreszenz. | 56 |
| Abbildung 3.8: Expressionsanalyse der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV mittels Immunblot | 57 |
| Abbildung 3.9: Bindungsanalyse der originalen Maus Antikörper gegen ST8SiaII und ST8SiaIV mittels ELISA | 58 |
| Abbildung 3.10: Bindungsanalyse der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies mittels ELISA | 59 |
| Abbildung 3.11: Immunpräzipitation der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV sowie Bindungsanalyse der Intrabodies anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV mittels Ko- Immunpräzipitation | 60 |
| Abbildung 3.12: Nachweis der ER-Lokalisation der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies sowie der Golgi-Lokalisation der Polysialyltransferasen mittels Immunfluoreszenz | 62 |
| Abbildung 3.13: Nachweis der ER-Retention der Polysialyltransferasen durch Expression der anti- ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies mittels Immunfluoreszenz..... | 63 |
| Abbildung 3.14: Ermittlung der Expressionsdauer des anti-ST8SiaII Intrabody nach transienter Transfektion von CHO-2A10+500-Zellen mittels Immunpräzipitation..... | 64 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 3.15: Nachweis der reduzierten Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM auf rekombinanten CHO-Zellen durch Expression der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies mittels Durchflusszytometrie | 66 |
| Abbildung 3.16: Nachweis der reduzierten Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM bei rekombinanten CHO-Zellen durch Expression der anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabodies sowie Detektion von NCAM mittels Immunblot | 67 |
| Abbildung 3.17: Nachweis der ER-Retention des NCAM durch Expression des anti-NCAM Intrabody mittels Immunfluoreszenz..... | 70 |
| Abbildung 3.18: Proliferationsassay sowie Expressions- und Funktionsanalyse der stabilen Intrabody-exprimierenden TE671-Zelllinien mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie | 72 |
| Abbildung 3.19: Untersuchungen zur unvollständigen Reduzierung der Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM in der stabilen anti-ST8SiaII und anti-ST8SiaIV Intrabody-exprimierenden TE671-Zelllinie | 75 |
| Abbildung 3.20: Visualisierung des Tumorwachstums nach intraperitonealer Injektion stabiler TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien in C57BL/6J RAG-2 Mäusen mittels IVIS | 76 |
| Abbildung 3.21: Visualisierung des Tumorwachstums nach intraperitonealer Injektion stabiler TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien in C57BL/6J RAG-2 Mäusen mittels IVIS | 77 |
| Abbildung 3.22: Visualisierung des Tumorwachstums nach intraperitonealer Injektion stabiler TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien in C57BL/6J RAG-2 Mäusen mittels IVIS | 77 |
| Abbildung 3.23: Bestimmung der Intensität der Lumineszenz nach intraperitonealer Injektion der stabilen Intrabody- und Luziferase-exprimierenden TE671-Rhabdomyosarkom-Zelllinien in C57BL/6J RAG-2 Mäusen mittels IVIS | 78 |
| Abbildung 6.1: pCR2.1-Vektorkarte (Invitrogen) | 91 |
| Abbildung 6.2: pCMV/myc/ER-Vektorkarte (Invitrogen) | 92 |
| Abbildung 6.3: Basen- und Aminosäuresequenz des anti-ST8SiaII Intrabody (STX3167)..... | 93 |
| Abbildung 6.4: Basen- und Aminosäuresequenz des anti-ST8SiaIV Intrabody (PST3175)..... | 94 |
| | |
| Tabelle 1.1: Auswahl einiger Intrabody-Antigene der jüngeren Zeit. | 23 |
| Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Antikörper | 26 |
| Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Enzyme und Proteine | 26 |
| Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Geräte | 27 |
| Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits | 27 |
| Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien | 28 |
| Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Molekulargewichtsmarker | 29 |
| Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide (Eurofins MWG Operon) | 29 |
| Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Plasmide und Vektoren..... | 30 |
| Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten Programme | 30 |
| Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Reagenzien | 31 |
| Tabelle 2.11: Auflistung der verwendeten Zelllinien | 31 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 2.12: Programm für die Polymerase-Kettenreaktion..... | 35 |
| Tabelle 2.13: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes | 35 |
| Tabelle 2.14: <i>assembly</i> -PCR-Programme | 37 |
| Tabelle 2.15: Antibiotika-Konzentration für die Generierung stabiler Zelllinien | 42 |
| Tabelle 2.16: In der Immunfluoreszenz eingesetzte Antikörper in Abhängigkeit des Zielproteins | 43 |
| Tabelle 2.17: Im Immunblot eingesetzte Antikörper in Abhängigkeit des Zielproteins | 46 |
| Tabelle 3.1: Verwendete Klone der stabilen TE671-Zelllinien. | 71 |

7. Literaturverzeichnis

- Acheson A, Sunshine J, Rutishauser U (1991). NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J Cell Biol* **114**, 143-153.
- Ahmad A, Hart IR (1997). Mechanisms of metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol* **26**, 163-173.
- Alvarez RD, Barnes MN, Gomez-Navarro J, Wang M, Strong TV, Arafat W, Arani RB, Johnson MR, Roberts BL, Siegal GP, Curiel DT (2000). A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin Cancer Res* **6**, 3081-3087.
- Angata K, Huckaby V, Ranscht B, Tersikh A, Marth JD, Fukuda M (2007). Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors is essential for mouse brain development. *Mol Cell Biol* **27**, 6659-6668.
- Angata K, Long JM, Bukalo O, Lee W, Dityatev A, Wynshaw-Boris A, Schachner M, Fukuda M, Marth JD (2004). Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *J Biol Chem* **279**, 32603-32613.
- Angata K, Nakayama J, Fredette B, Chong K, Ranscht B, Fukuda M (1997). Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule - tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *J Biol Chem* **272**, 7182-7190.
- Angata K, Suzuki M, Fukuda M (1998). Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX. *J Biol Chem* **273**, 28524-28532.
- Angata K, Suzuki M, McAuliffe J, Ding Y, Hindsgaul O, Fukuda M (2000). Differential Biosynthesis of Polysialic Acid on NCAM and Oligosaccharide Acceptors by Three Distinct α 2,8-Sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. *J Biol Chem* **275**, 18594-18601.
- Angata T, Varki A (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* **102**, 439-469.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* **50**, 197-263.
- Barthels D, Vopper G, Boned A, Cremer H, Wille W (1992). High Degree of NCAM Diversity Generated by Alternative RNA Splicing in Brain and Muscle. *Eur J Neurosci* **4**, 327-337.
- Baumann H, Brisson JR, Michon F, Pon R, Jennings, HJ (1993). Comparison of the conformation of the epitope of α (2 \rightarrow 8) polysialic acid with its reduced and N-acyl derivatives. *Biochemistry* **32**, 4007-4013.
- Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M (1996). The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* **45**, 143-152.
- Beecken WD, Engl T, Ogbomo H, Relja B, Cinatl J, Bereiter-Hahn J, Oppermann E, Jonas D, Blaheta RA (2005). Valproic acid modulates NCAM polysialylation and polysialyltransferase mRNA expression in human tumor cells. *Int Immunopharmacol* **5**, 757-769.
- Beerli RR, Wels W, Hynes NE (1994). Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation. *J Biol Chem* **269**, 23931-23936.
- Berski S, van Bergeijk J, Schwarzer D, Stark Y, Kasper C, Scheper T, Grothe C, Gerardy-Schahn R, Kirschning A, Dräger G (2008). Synthesis and biological evaluation of a polysialic acid-based hydrogel as enzymatically degradable scaffold material for tissue engineering. *Biomacromolecules* **9**, 2353-2359.

- Biocca S, Neuberger MS, Cattaneo A (1990). Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *EMBO J* **9**, 101-108.
- Blazek D, Celer V, Navrátilová I, Skládal P (2004). Generation and characterization of single-chain antibody fragments specific against transmembrane envelope glycoprotein gp46 of maedi-visna virus. *J Virol Methods* **115**, 83-92.
- Bock E, Edvardsen K, Gibson A, Linnemann D, Lyles JM, Nybroe O (1987). Characterization of soluble forms of NCAM. *FEBS Lett* **225**, 33-36.
- Bogenrieder T, Herlyn M (2003). Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**, 6524-6536.
- Böldicke T, Somplatzki S, Sergeev G, Mueller PP (2012). Functional inhibition of transitory proteins by intrabody-mediated retention in the endoplasmatic reticulum. *Methods* **56**, 338-350.
- Böldicke T, Weber H, Mueller PP, Barleon B, Bernal M (2005). Novel highly efficient intrabody mediates complete inhibition of cell surface expression of the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/KDR). *J Immunol Methods* **300**, 146-159.
- Böldicke T (2007). Blocking translocation of cell surface molecules from the ER to the cell surface by intracellular antibodies targeted to the ER. *J Cell Mol Med* **11**, 54-70.
- BouHamdan M, Strayer DS, Wei D, Mukhtar M, Duan LX, Hoxie J, Pomerantz RJ (2001). Inhibition of HIV-1 infection by down-regulation of the CXCR4 co-receptor using an intracellular single chain variable fragment against CXCR4. *Gene Ther* **8**, 408-418.
- Brackenbury R, Thiery JP, Rutishauser U, Edelman GM (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. *J Biol Chem* **252**, 6835-6840.
- Bresalier RS, Ho SB, Schoeppner HL, Kim YS, Sleisenger MH, Brodt P, Byrd JC (1996). Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterol* **110**, 1354-1367.
- Bronner-Fraser M, Wolf JJ, Murray BA (1992). Effect of antibodies against N-Cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Dev Biol* **153**, 291-301.
- Bruses JL, Rutishauser U (1998). Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation: evidence for nontranscriptional control and sensitivity to an intracellular pool of calcium. *J Cell Biol* **140**, 1177-1186.
- Burg MA, Halfter W, Cole GJ (1995). Analysis of proteoglycan expression in developing chicken brain: characterization of a heparan sulfate proteoglycan that interacts with the neural cell adhesion molecule. *J Neurosci Res* **41**, 49-64.
- Burroughs CL, Watanabe M, Morse DE (1991). Distribution of the neural cell adhesion molecule (NCAM) during heart development. *J Mol Cell Cardiol* **23**, 1411-1422.
- Cao Y (2005). Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* **5**, 735-743.
- Cardinale A, Filesi I, Mattei S, Biocca S (2004). Intracellular targeting and functional analysis of single-chain Fv fragments in mammalian cells. *Methods* **34**, 171-178.
- Cardinale A, Filesi I, Vetrugno V, Pocchiari M, Sy MS, Biocca S (2005). Trapping prion protein in the endoplasmic reticulum impairs PrPC maturation and prevents PrPSc accumulation. *J Biol Chem* **280**, 685-694.
- Carlson JR (1988). A new means of inducibly inactivating a cellular protein. *Mol Cell Biol* **8**, 2638-2646.

- Carson W, Caligiuri M (1996). Natural killer cell subsets and development. *Methods* **9**, 327-343.
- Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M, Christofori G (2001). N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol* **3**, 650-657.
- Chen SY, Bagley J, Marasco WA (1994). Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy. *Hum Gene Ther* **5**, 595-601.
- Close BE, Colley KJ (1998). In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. *J Biol Chem* **273**, 34586-34593.
- Close BE, Mendiratta SS, Geiger KM, Broom LJ, Ho LL, Colley KJ (2003). The minimal structural domains required for neural cell adhesion molecule polysialylation by PST/ST8Sia IV and STX/ST8Sia II. *J Biol Chem* **278**, 30796-30805.
- Cochet O, Kenigsberg M, Delumeau I, Virone-Oddos A, Multon MC, Fridman WH, Schweighoffer F, Teillaud JL, Tocque B (1998). Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res* **58**, 1170-1176.
- Cole GJ, Glaser L (1986). A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J Cell Biol* **102**, 403-412.
- Cole GJ, Loewy A, Cross NV, Akeson R, Glaser L (1986a). Topographic localization of the heparin-binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Cell Biol* **103**, 1739-1744.
- Cole GJ, Loewy A, Glaser L (1986b). Neuronal cell-cell adhesion depends on interactions of N-CAM with heparin-like molecules. *Nature* **320**, 445-447.
- Conte C, Dastugue B, Vaury C (2002). Promoter competition as a mechanism of transcriptional interference mediated by retrotransposons. *EMBO J* **21**, 3908-3916.
- Cremer H, Chazal G, Carleton A, Goridis C, Vincent JD, Lledo PM (1998). Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13242-13247.
- Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A (1997). NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus *Mol Cell Neurosci* **8**, 323-335.
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* **367**, 455-459.
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulinlike domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **236**, 799-806.
- Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D, Stamatou NM (2007). Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem* **282**, 30346-30356.
- Daniel L, Durbec P, Gautherot E, Rouvier E, Rougon G, Figarella-Branger D (2001). A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process. *Oncogene* **20**, 997-1004.
- Daniel L, Trouillas J, Renaud W, Chevallier P, Gouvernet J, Rougon G, Figarella-Branger D (2000). Polysialylated-neural cell adhesion molecule expression in rat pituitary transplantable tumors (spontaneous mammatropic transplantable tumor in Wistar-Furth rats) is related to growth rate and malignancy. *Cancer Res* **60**, 80-85.
- Datta AK, Paulson JC (1995). The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J Biol Chem* **270**, 1497-1500.

- Datta AK, Sinha A, Paulson JC (1998). Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *J Biol Chem* **273**, 9608-9614.
- Deshane J, Loechel F, Conry RM, Siegal GP, King CR, Curiel DT (1994). Intracellular single-chain antibody directed against erbB2 down-regulates cell surface erbB2 and exhibits a selective anti-proliferative effect in erbB2 overexpressing cancer cell lines. *Gene Ther* **1**, 332-337.
- Dityatev A, Dityateva G, Sytnyk V, Dellling M, Toni N, Nikonenko I, Muller D, Schachner M (2004). Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *J Neurosci* **24**, 9372-9382.
- Doherty P, Fruns M, Seaton P, Dickson G, Barton CH, Sears TA, Walsh FS (1990). A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* **343**, 464-466.
- Doherty P, Walsh FS (1992). Cell adhesion molecules, second messengers and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* **2**, 595-601.
- Doyle E, Nolan PM, Bell R, Regan CM (1992). Hippocampal NCAM180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in the adult rat. *J Neurosci Res* **31**, 513-523.
- Durbec P, Cremer H (2001). Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system. *Mol Neurobiol* **24**, 53-64.
- Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, Dityatev A (2000). Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci* **20**, 5234-5244.
- Eckhardt M, Gerardy-Schahn R (1998). Genomic organization of the murine polysialyltransferase gene ST8SiaIV (PST-1). *Glycobiology* **8**, 1165-1172.
- Eckhardt M, Mühlenhoff M, Bethe A, Koopman J, Frosch M, Gerardy-Schahn R (1995). Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature* **373**, 715-718.
- Edelman GM, Chuong CM (1982). Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7036-7040.
- Edvardsen K, Pedersen PH, Bjerkvig R, Hermann GG, Zeuthen J, Laerum OD, Walsh FS, Bock E (1994). Transfection of glioma cells with the neural-cell adhesion molecule NCAM: effect on glioma-cell invasion and growth in vivo. *Int J Cancer* **58**, 116-122.
- Farag SS, Caligiuri MA (2006). Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* **20**, 123-137.
- Fidler IJ (2002). Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* **12**, 89-96.
- Fidzianska A, Kaminska A (1995). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) as a marker of muscle tissue alternations: review of the literature and own observations. *Folia Neuropathol* **33**, 125-128.
- Fields RD, Itoh K (1996). Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **19**, 473-480.
- Figarella-Branger D, Durbec PL, Rougon GN (1990). Differential spectrum of expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors. *Cancer Res* **50**, 6364-6370.
- Figini M, Ferri R, Mezzanzanica D, Bagnoli M, Luisson E, Miotti S, Canevari S (2003). Reversion of transformed phenotype in ovarian cancer cells by intracellular expression of anti folate receptor antibodies. *Gene Ther* **10**, 1018-1025.

- Filiz S, Dalcik H, Yardimoglu M, Gonca S, Ceylan S (2002). Localization of neural cell adhesion molecule (N-CAM) immunoreactivity in adult rat tissues. *Biotech Histochem* **77**, 127-135.
- Finne J (1982). Occurrence of unique polysialyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem* **257**, 11966-11970.
- Fogar P, Basso D, Pasquali C, De Paoli M, Sperti C, Roveroni G, Pedrazzoli S, Plebani M (1997). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res* **17**, 1227-1230.
- Foley A, Hartz BP, Gallagher HC, Ronn LC, Berezin V, Bock E, Regan CM (2000). A synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule (NCAM) IgI domain prevents NCAM internalization and disrupts passive avoidance learning. *J Neurochem* **74**, 2607-2613.
- Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* **125**, 669-680.
- Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, Bitter-Suermann D (1985). NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1194-1198.
- Fujimoto I, Bruses JL, Rutishauser U (2001). Regulation of cell adhesion by polysialic acid: Effects on cadherin, IgCAM and integrin function and independence from NCAM binding or signaling activity. *J Biol Chem* **276**, 31745-31751.
- Fuster MM, Esko JD (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **5**, 526-542.
- Gallagher HC, Murphy KJ, Foley AG, Regan CM (2001). Protein kinase C delta regulates neural cell adhesion molecule polysialylation state in the rat brain. *J Neurochem* **77**, 425-434.
- Gallagher HC, Odumeru OA, Regan CM (2000). Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation state by cell-cell contact and protein kinase C delta. *J Neurosci Res* **61**, 636-645.
- Galuska SP, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Mühlenhoff M, Geyer H (2008). Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo. *J Biol Chem* **283**, 17-28.
- Galuska SP, Oltmann-Norden I, Geyer H, Weinhold B, Kuchelmeister K, Hildebrandt H, Gerardy-Schahn R, Geyer R, Mühlenhoff M (2006). Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *J Biol Chem* **281**, 31605-31615.
- Galuska SP, Rollenhagen M, Kaup M, Eggers K, Oltmann-Norden I, Schiff M, Hartmann M, Weinhold B, Hildebrandt H, Geyer R, Mühlenhoff M, Geyer H (2010). Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10250-10255.
- Gascon E, Vutsits L, Kiss JZ (2007). Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev* **56**, 101-118.
- Gerardy-Schahn R, Bethe A, Brennecke T, Mühlenhoff M, Eckhardt M, Ziesing S, Lottspeich F, Frosch M (1995). Molecular cloning and functional expression of bacteriophage PK1E-encoded endoneuraminidase Endo NE. *Mol Microbiol* **16**, 441-450.
- Geyer H, Bahr U, Liedtke S, Schachner M, Geyer R (2001). Core structures of polysialylated glycans present in neural cell adhesion molecule from newborn mouse brain. *Eur J Biochem* **268**, 6587-6599.
- Glüer S, Schelp C, Madry N, von Schweinitz D, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R (1998a). Serum polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood neuroblastoma. *Br J Cancer* **78**, 106-110.
- Glüer S, Schelp C, Von Schweinitz D, Gerardy-Schahn R (1998b). Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediat Res* **43**, 145-147.

- Goncalves J, Silva F, Freitas-Vieira A, Santa-Marta M, Malh  R, Yang X, Gabuzda D, Barbas C 3rd (2002). Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication. *J Biol Chem* **35**, 32036-32045.
- Gower HJ, Walsh FS (1989). Neuronal process outgrowth of human sensory neurons on monolayers of cells transfected with cDNAs for five human N-CAM isoforms. *J Cell Biol* **109**, 789-798.
- Greger IH, Aranda A, Proudfoot N (2000). Balancing transcriptional interference and initiation on the GAL7 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8415-8420.
- Grumet M, Flaccus A, Margolis RU (1993). Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* **120**, 815-824.
- Grunert S, Jechlinger M, Beug H (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 657-665.
- Guillaume-Rousselet N, Jean D, Frade R (2002). Cloning and characterization of anti-cathepsin L single chain variable fragment whose expression inhibits procathepsin L secretion in human melanoma cells. *Biochem J* **367**, 219-227.
- Gumbiner BM (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 622-634.
- Hammerschmidt S, M ller A, Sillmann H, Mühlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M (1996). Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* **20**, 1211-1220.
- Hammond MS, Sims C, Parameshwaran K, Suppiramaniam V, Schachner M, Dityatev A (2006). Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid inhibits NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors and prevents glutamate-induced cell death. *J Biol Chem* **281**, 34859-34869.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hansen OC, Nybroe O, Bock E (1985). Cell-free synthesis of the D2-cell adhesion molecule: evidence for three primary translation products. *J Neurochem* **44**, 712-717.
- He HT, Finne J, Goridis C (1987). Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol linked form of the neural cell adhesion molecule. *J Cell Biol* **105**, 2489-2500.
- Heintges T, zu P litz J, Wands JR (1999). Characterization and binding of intracellular antibody fragments to the hepatitis C virus core protein. *Biochem Biophys Res Commun* **263**, 410-418.
- Hildebrandt H, Becker C, M rau M, Gerardy-Schahn R, Rahmann H (1998). Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J Neurochem* **71**, 2339-2348.
- Hildebrandt H, Mühlenhoff M, Weinhold B, Gerardy-Schahn R (2007). Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. *J Neurochem* **103**, 56-64.
- Hirn M, Ghandour MS, Deagostini-Bazin H, Goridis C (1983). Molecular heterogeneity and structural evolution during cerebellar ontogeny detected by monoclonal antibody of the mouse cell surface antigen BSP-2. *Brain Res* **265**, 87-100.
- Hoffman S, Sorkin BC, White PC, Brackenbury R, Mailhammer R, Rutishauser U, Cunningham BA, Edelman GM (1982). Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J Biol Chem* **257**, 7720-7729.
- Hoffmann S, Chuong CM, Edelman GM (1984). Evolutionary conservation of key structures and binding functions of neural cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6881-6885.

- Horstkorte R, Mühlenhoff M, Reutter W, Nöhring S, Zimmermann-Kordmann M, Gerardy-Schahn R (2004). Selective inhibition of polysialyltransferase ST8SiaII by unnatural sialic acids. *Exp Cell Res* **298**, 268-274.
- Hubschmann MV, Skladchikova G, Bock E, Berezin V (2005). Neural cell adhesion molecule function is regulated by metalloproteinase-mediated ectodomain release. *J Neurosci Res* **80**, 826-837.
- Huerta S, Srivatsan ES, Venkatesan N, Peters J, Moatamed F, Renner S, Livingston EH (2001). Alternative mRNA splicing in colon cancer causes loss of expression of neural cell adhesion molecule. *Surgery* **130**, 834-843.
- Humphries MJ (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans* **28**, 311-339.
- Hust M, Frenzel A, Meyer T, Schirrmann T, Dübel S (2012). Construction of human naive antibody gene libraries. *Methods Mol Biol* **907**, 185-107.
- Hust M, Jostock T, Menzel C, Voedisch B, Mohr A, Brenneis M, Kirsch MI, Meier D, Dübel S (2007). Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol* **7**, 14.
- Hynes RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687.
- Inoue S, Lin SL, Inoue Y (2000). Chemical analysis of the developmental pattern of polysialylation in chicken brain. Expression of only an extended form of polysialyl chains during embryogenesis and the presence of disialyl residues in both embryonic and adult chicken brains. *J Biol Chem* **275**, 29968-29979.
- Jannot CB, Beerli RR, Mason S, Gullick WJ, Hynes NE (1996). Intracellular expression of a single-chain antibody directed to the EGFR leads to growth inhibition of tumor cells. *Oncogene* **13**, 275-282.
- Jarvis GA, Vedros NA (1987). Sialic acid of group B Neisseria meningitidis regulates alternative complement pathway activation. *Infect Immun* **55**, 174-180.
- Jendreyko N, Popkov M, Beerli RR, Chung J, McGavern DB, Rader C, Barbas CF 3rd (2003). Intradiabodies, bispecific, tetravalent antibodies for the simultaneous functional knockout of two cell surface receptors. *J Biol Chem* **278**, 47812-47819.
- Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, Leckband DE (2005). Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem* **280**, 137-145.
- Jorgensen OS (1995). Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochem Res* **20**, 533-547.
- Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M (1990a). Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J Cell Biol* **110**, 209-218.
- Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M (1990b). The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* **110**, 193-208.
- Kaiser U, Auerbach B, Oldenburg M (1996). The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma* **20**, 389-395.
- Kalus I, Bormann U, M'Zoughi M, Schachner M, Kleene R (2006). Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J Neurochem* **98**, 78-88.
- Karthe J, Tessmann K, Li J, Machida R, Daleman M, Häussinger D, Heintges T (2008). Specific targeting of hepatitis C virus core protein by an intracellular single-chain antibody of human origin. *Hepatology* **48**, 702-712.
- Keilhauer G, Faissner A, Schachner M (1985). Differential inhibition of neuron-neuron, neuron-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and NCAM antibodies. *Nature* **316**, 728-730.

- Kern WF, Spier CM, Hanneman EH, Miller TP, Matzner M, Grogan TM (1992). Neural cell adhesion molecule-positive peripheral T-cell lymphoma: a rare variant with propensity for unusual sites of involvement. *Blood* **79**, 2432-2437.
- Keys TG, Freiburger F, Ehrh J, Krueger J, Eggers K, Buettner FF, Gerardy-Schahn R (2012). A universal fluorescent acceptor for high-performance liquid chromatography analysis of pro- and eukaryotic polysialyltransferases. *Anal Biochem* **427**, 107-115.
- Kirschning CJ, Dreher S, Maass B, Fichte S, Schade J, Köster M, Noack A, Lindenmaier W, Wagner H, Böldicke T (2010). Generation of anti-TLR2 intrabody mediating inhibition of macrophage surface TLR2 expression and TLR2-driven cell activation. *BMC Biotechnol* **10**, 31.
- Kiselyov VV, Skladchikova G, Hinsby AM, Jensen PH, Kulahin N, Soroka V, Pedersen N, Tsetlin V, Poulsen FM, Berezin V, Bock E (2003). Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure* **11**, 691-701.
- Kiss JZ, Wang C, Olive S, Rougon G, Lang J, Baetens D, Harry D, Pralong WF (1994). Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *EMBO J* **13**, 5284-5292.
- Koistinen P, Ahonen M, Kähäri VM, Heino J (2004). α V integrin promotes in vitro and in vivo survival of cells in metastatic melanoma. *Int J Cancer* **112**, 61-70.
- Kojima N, Tachida Y, Tsuji S (1997). Two polysialic acid synthases, mouse ST8SiaII and IV, synthesize different degree of polysialic acids on different substrate glycoprotein in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. *J Biochem* **122**, 1265-1273.
- Kojima N, Tachida Y, Yoshida Y, Tsuji S (1996). Characterization of mouse ST8SiaII (STX) as a neural cell adhesion molecule-specific polysialic acid synthase. *J Biol Chem* **271**, 19457-19463.
- Kojima N, Yoshida Y, Tsuji S (1995). A developmentally regulated member of the sialyltransferase family (ST8Sia II, STX) is a polysialic acid synthase. *FEBS Lett* **373**, 119-122.
- Kolkova K (2010). Biosynthesis of NCAM. *Adv Exp Med Biol* **663**, 213-225.
- Komminoth P, Roth J, Lackie PM, Bitter-Suermann D, Heitz PU (1991). Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule distinguishes small cell lung carcinoma from carcinoids. *Am J Pathol* **139**, 297-304.
- Kontermann RE (2004). Intrabodies as therapeutic agents. *Methods* **34**, 163-70.
- Kopfstein L, Christofori G (2006). Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci* **63**, 449-468.
- Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K, Baralle FE (1985). Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J* **4**, 1755-1759.
- Kudo M, Kitajima K, Inoue S, Shiokawa K, Morris HR, Dell A, Inoue Y (1996). Characterization of the major core structures of the α 2 \rightarrow 8-linked polysialic acid-containing glycan chains present in neural cell adhesion molecule in embryonic chick brains. *J Biol Chem* **271**, 32667-32677.
- Kurosawa N, Yoshida Y, Kojima N, Tsuji S (1997). Polysialic acid synthase (ST8Sia II STX) mRNA expression in the developing mouse central nervous system. *J Neurochem* **69**, 494-503.
- Lackie PM, Zuber C, Roth J (1994). Polysialic acid for the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. *Differentiation* **57**, 119-131.
- Ladiges W, Osman GE (2000). Molecular characterization of immunoglobulin genes. In: Howard GC, Bethell DR (Ed.), *Basic Methods in Antibody Production and Characterization*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, London.

- Lanier LL, Chang C, Azuman M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH (1991). Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (NCAM/CD 56). *J Immunol* **146**, 4421-4426.
- Lehembre F, Yilmaz M, Wicki A, Schomber T, Strittmatter K, Ziegler D, Kren A, Went P, Derksen PW, Berns A, Jonkers J, Christofori G (2008). NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *EMBO J* **27**, 2603-2615.
- Liao W, Strube RW, Milne RW, Chen SY, Chan L (2008). Cloning of apoB intrabodies: specific knockdown of apoB in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **373**, 235-240.
- Liedtke S, Geyer H, Wuhler M, Geyer R, Frank G, Gerardy-Schahn R, Zähringer U, Schachner M (2001). Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. *Glycobiology* **11**, 373-384.
- Linnemann D, Gaardsvoll H, Olsen M, Bock E (1993). Expression of NCAM mRNA and polypeptides in aging rat brain. *Int J Dev Neurosci* **11**, 71-81.
- Livingston BD, Paulson JC (1993). Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J Biol Chem* **268**, 11504-11507.
- Lo AS, Zhu Q, Marasco WA (2008). Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. *Handb Exp Pharmacol* **181**, 343-373.
- Lobato MN, Rabbitts TH (2003). Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends Mol Med* **9**, 390-396.
- Lyles JM, Linnemann D, Bock E (1984). Biosynthesis of the D2-cell adhesion molecule: post-translational modifications, intracellular transport, and developmental changes. *J Cell Biol* **99**, 2082-2091.
- Marasco WA, Haseltine WA, Chen SY (1993). Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7889-7893.
- Marasco WA (1995). Intracellular antibodies (intrabodies) as research reagents and therapeutic molecules for gene therapy. *Immunotechnology* **1**, 1-19.
- Markram, K., Gerardy-Schahn, R., Sandi, C (2007). Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience* **144**, 788-96.
- Mendiratta SS, Sekulic N, Hernandez-Guzman FG, Close BE, Lavie A, Colley KJ (2006). A novel alpha-helix in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule is critical for Nglycan polysialylation. *J Biol Chem* **281**, 36052-36059.
- Mhashilkar AM, Bagley J, Chen SY, Szilvay AM, Helland DG, Marasco WA (1995). Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO J* **14**, 1542-1551.
- Mhashilkar AM, Doeblis C, Seifert M, Busch A, Zani C, Soo Hoo J, Nagy M, Ritter T, Volk HD, Marasco WA (2002). Intrabody-mediated phenotypic knockout of major histocompatibility complex class I expression in human and monkey cell lines and in primary human keratinocytes. *Gene Ther* **9**, 307-319.
- Milev P, Maurel P, Haring M, Margolis RK, Margolis RU (1996). TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase- ζ/β , and N-CAM. *J Biol Chem* **271**, 15716-15723.
- Moscato LM, Cremer H, Sanes JR (1998). Organization and reorganization of neuromuscular junctions in mice lacking neural cell adhesion molecule, tenascin-C or fibroblast growth factor-5. *J Neurosci* **18**, 1465-1477.

- Mühlenhoff M, Eckhardt M, Bethe A, Frosch M, Gerardy-Schahn R (1996a). Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *EMBO J* **15**, 6943-6950.
- Mühlenhoff M, Eckhardt M, Bethe A, Frosch M, Gerardy-Schahn R (1996b). Polysialylation of NCAM by a single enzyme. *Curr Biol* **6**, 1188-1191.
- Mühlenhoff M, Manegold A, Windfuhr M, Gotza B, Gerardy-Schahn R (2001). The impact of n-glycosylation on the functions of polysialyltransferases. *J Biol Chem* **276**, 34066-34073.
- Munro S, Pelham HR (1987). C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
- Nakata D, Troy FA 2nd (2005). Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS. *J Biol Chem* **280**, 38305-38316.
- Nakayama J, Fukuda MN, Fredette B, Ranscht B, Fukuda M (1995). Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7031-7035.
- Nam CH, Moutel S, Teillaud JL (2002). Generation of murine scFv intrabodies from B-cell hybridomas. *Methods Mol Biol* **193**, 301-327.
- Neale SA, Trasler DG (1994). Early sialylation on N-CAM in splotch neural tube defect mouse embryos. *Teratology* **50**, 118-124.
- Nelson RW, Bates PA, Rutishauser U (1995). Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* **270**, 17171-17179.
- Newgreen DF, Kerr RS, Minichiello J, Warren N (1997). Changes in cell adhesion and extracellular matrix molecules in spontaneous spinal neural tube defects in avian embryos. *Teratology* **55**, 195-207.
- Oltmann-Norden I, Galuska SP, Hildebrandt H, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Geyer H, Mühlenhoff M (2008). Impact of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. *J Biol Chem* **283**, 1463-1471.
- Ong E, Nakayama J, Angata K, Reyes L, Katsuyama T, Arai Y, Fukuda M (1998). Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology* **8**, 415-424.
- Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1994). N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* **13**, 595-609.
- Owens G, Edelmann GM, Cunningham BA (1987). Organization of the neural adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 294-298.
- Paganetti P, Calanca V, Galli C, Stefani M, Molinari M (2005). beta-site specific intrabodies to decrease and prevent generation of Alzheimer's A β peptide. *J Cell Biol* **168**, 863-868.
- Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* **113**, 867-879.
- Peng JL, Wu S, Zhao XP, Wang M, Li WH, Shen X, Liu J, Lei P, Zhu HF, Shen GX (2007). Downregulation of transferrin receptor surface expression by intracellular antibody. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 864-871.
- Perl AK, Dahl U, Wilgenbus P, Cremer H, Semb H, Christofori G (1999). Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells. *Nat Med* **5**, 286-291.

- Persic L, Righi M, Roberts A, Hoogenboom HR, Cattaneo A, Bradbury A (1997). Targeting vectors for intracellular immunisation. *Gene* **187**, 1-8.
- Persohn E, Pollerberg GE, Schachner M (1989). Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes *J Comp Neurol*. **288**, 92-100.
- Phillips GR, Krushel LA, Crossin KL (1997). Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Brain Res Dev Brain Res* **102**, 143-155.
- Pollerberg EG, Sadoul R, Goridis C, Schachner M (1985). Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development. *J Cell Biol* **101**, 1921-1929.
- Pope AR, Embleton MJ, Mernaugh R (1996). Construction and use of antibody gene repertoires. In: McAfferty J, Hoogenboom HR, Chiswell DJ (Ed.), *Antibody engineering: a practical approach*. Oxford University Press USA, New York.
- Popkov M, Jendreyko N, McGavern DB, Rader C, Barbas CF 3rd (2005). Targeting tumor angiogenesis with adenovirus-delivered anti-Tie-2 intrabody. *Cancer Res* **65**, 972-981.
- Probstmeier R, Bilz A, Schneider-Schaulies J (1994). Expression of the neural cell adhesion molecule and polysialic acid during early mouse embryogenesis. *J Neurosci Res* **37**, 324-335.
- Probstmeier R, Kuhn K, Schachner M (1989). Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *J Neurochem* **53**, 1794-1801.
- Puente-Polledo L, Reglero A, Gonzalez-Clemente C, Rodriguez-Aparicio LB, Ferrero MA (1998). Biochemical conditions for the production of polysialic acid by *Pasteurella haemolytica* A2. *Glycoconj J* **15**, 855-861.
- Rabinowitz J, Rutishauser U, Magnuson T (1996). Targeted mutation of NCAM to produce a secreted molecule results in a dominant embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6421-6424.
- Read RC, Zimmerli S, Broaddus C, Sanan DA, Stephens DS, Ernst JD (1996). The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. *Infect Immun* **64**, 3210-3217.
- Richardson JH, Sodroski JG, Waldmann TA, Marasco WA (1995). Phenotypic knockout of the high-affinity human interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the α subunit of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3137-3141.
- Rolf B, Bastmeyer M, Schachner M, Bartsch U (2002). Pathfinding errors of corticospinal axons in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *J Neurosci* **22**, 8357-8362.
- Rondon IJ, Marasco WA (1997). Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases. *Annu Rev Microbiol* **51**, 257-83.
- Rosen CL, Lisanti MP, Salzer JL (1992). Expression of unique sets of GPI-linked proteins by different primary neurons in vitro. *J Cell Biol* **117**, 617-627.
- Rosso MN, Schouten A, Roosien J, Borst-Vrenssen T, Hussey RS, Gommers FJ, Bakker J, Schots A, Abad P (1996). Expression and functional characterization of a single chain Fv antibody directed against secretions involved in plant nematode infection process. *Biochem Biophys Res Commun*. **220**, 255-263.
- Roth J, Kempf A, Reuter G, Schauer R, Gehring WJ (1992). Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* **256**, 673-675.
- Roth J, Zuber C, Wagner P, Taatjes DJ, Weisgerber C, Heitz PU, Goridis C, Bitter-Suermann D (1988). Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2999-3003.

- Rothbard JB, Brackenbury R, Cunningham BA, Edelman GM (1982). Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J Biol Chem* **257**, 11064-11069.
- Ruoslahti E, Öbrink B (1996). Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res* **227**, 1-11.
- Rutishauser U, Landmesser L (1996). Polysialic acid in the vertebrate nervous system – a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci* **19**, 422-427.
- Rutishauser U, Thiery JP, Brackenbury R, Sela BA, Edelman GM (1976). Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 577-581.
- Safarnejad MR, Jouzani GS, Tabatabaei M, Twyman RM, Schillberg S (2011). Antibody-mediated resistance against plant pathogens. *Biotechnol Adv* **29**, 961-71.
- Santoni MJ, Barthels D, Vopper G, Boned A, Goridis C, Wille W (1989). Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain. *EMBO J* **8**, 385-392.
- Sasaki H, Yoshida K, Ikeda E, Asou H, Inaba M, Otani M, Kawase T (1998). Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors: an inverse correlation with malignancy. *Cancer* **82**, 1921-1931.
- Schächner M (1991). Cell surface recognition and neuron-glia interactions. *Ann N Y Acad Sci* **633**, 105-112.
- Scheidegger EP, Lackie PM, Papay J, Roth J (1994). In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. *Lab Invest* **70**, 95-106.
- Scheidegger EP, Sternberg LR, Roth J, Lowe JB (1995). A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J Biol Chem* **270**, 22685-22688.
- Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* **314**, 1209-1225.
- Schreiber SC, Giehl K, Kastilan C, Hasel C, Mühlenhoff M, Adler G, Wedlich D, Menke A (2008). Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* **134**, 1555-1566.
- Schuch U, Lohse MJ, Schächner M (1989). Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* **3**, 13-20.
- Seidenfaden R, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H (2000). Control of NCAM polysialylation by the differential expression polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *Euro J Cell Biol* **79**, 680-688.
- Seidenfaden R, Hildebrandt H (2001). Retinoic acid-induced changes in NCAM polysialylation and polysialyltransferase mRNA expression of human neuroblastoma cells. *J Neurobiol* **46**, 11-28.
- Seki T, Rutishauser U (1998). Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *J Neurosci* **18**, 3757-3766.
- Sepp A, Farrar CA, Dorling T, Cairns T, George AJ, Lechler RI (1999). Inhibition of expression of the Galalpha1-3Gal epitope on porcine cells using an intracellular single-chain antibody directed against alpha1,3galactosyltransferase. *J Immunol Methods* **231**, 191-205.
- Serruys B, Van Houtte F, Verbrugghe P, Leroux-Roels G, Vanlandschoot P (2009). Llama-derived single-domain intrabodies inhibit secretion of hepatitis B virions in mice. *Hepatology* **49**, 39-49.

- Shen H, Watanabe M, Tomasiewicz H, Glass JD (2001). Genetic deletions of NCAM and PSA impair circadian function in the mouse. *Physiol Behav* **73**, 185-193.
- Small SJ, Haines SL, Akeson RA (1988). Polypeptide variation in an NCAM extracellular immunoglobulin-like fold is developmentally regulated through alternative splicing. *Neuron* **1**, 1007-1017.
- Sporns O, Edelman GM, Crossin KL (1995). The neural cell adhesion molecule (NCAM) inhibits proliferation in primary cultures of rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 542-546.
- Steinberger P, Andris-Widhopf J, Bühler B, Torbett BE, Barbas CF 3rd (2000). Functional deletion of the CCR5 receptor by intracellular immunization produces cells that are refractory to CCR5-dependent HIV-1 infection and cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 805-10.
- Stoenica L, Senkov O, Gerardy-Schahn R, Weinhold B, Schachner M, Dityatev A (2006). In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid. *Eur J Neurosci* **23**, 2255-2264.
- Stork O, Welzl H, Cremer H, Schachner M (1997). Increased intermale aggression and neuroendocrine response in mice deficient for the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Eur J Neurosci* **9**, 1117-1125.
- Stork O, Welzl H, Wotjak CT, Hoyer D, Dellling M, Cremer H, Schachner M (1999). Anxiety and increased 5-HT1A receptor response in NCAM null mutant mice. *J Neurobiol* **40**, 343-355.
- Storms SD, Anvekar VM, Adams LD, Murray BA (1996a). Heterophilic NCAM-mediated cell adhesion to proteoglycans from chick embryonic brain membranes. *Exp Cell Res* **223**, 385-394.
- Storms SD, Kim AC, Tran BH, Cole GJ, Murray BA (1996b). NCAM-mediated adhesion of transfected cells to agrin. *Cell Adhes Commun* **3**, 497-509.
- Storms SD, Rutishauser U (1998). A role for polysialic acid in neural cell adhesion molecule heterophilic binding to proteoglycans. *J Biol Chem* **273**, 27124-27129.
- Strebe N, Guse A, Schüngel M, Schirrmann T, Hafner M, Jostock T, Hust M, Müller W, Dübel S (2009). Functional knockdown of VCAM-1 at the posttranslational level with ER retained antibodies. *J Immunol Methods* **341**, 30-40.
- Stummeyer K, Dickmanns A, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, Ficner R (2005). Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 90-96.
- Sudol KL, Mastrangelo MA, Narrow WC, Frazer ME, Levites YR, Golde TE, Federoff HJ, Bowers WJ (2009). Generating differentially targeted amyloid-beta specific intrabodies as a passive vaccination strategy for Alzheimer's disease. *Mol Ther* **17**, 2031-2040.
- Suzuki M, Suzuki M, Nakayama J, Suzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M (2005). Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology* **15**, 887-894.
- Takashima S, Yoshida Y, Kanematsu T, Kojima N, Tsuji S (1998). Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase (mST8Sia IV/PST) gene. *J Biol Chem* **273**, 7675-7683.
- Takeichi M (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 619-27.
- Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K, Wada H (2000). Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **60**, 3072-3080.
- Theodosis D, Rougon G, Poulain DA (1991). Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamus-neurohypophyseal system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5494-5498.
- Thiery JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 442-454.

- Toikka J, Aalto J, Häyrynen J, Pelliniemi LJ, Finne J (1998). The Polysialic Acid Units of the Neural Cell Adhesion Molecule N-CAM Form Filament Bundle Networks. *J Biol Chem* **273**, 28557-28559.
- Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, Thompson C, Goridis C, Rutishauser U, Magnuson T (1993). Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (NCAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* **11**, 1163-1174.
- Tragoolpua K, Intasai N, Kasinrerk W, Mai S, Yuan Y, Tayapiwatana C (2008). Generation of functional scFv intrabody to abate the expression of CD147 surface molecule of 293A cells. *BMC Biotechnol* **8**, 5.
- Trouillas J, Daniel L, Guigard MP, Tong S, Gouvernet J, Jouanneau E, Jan M, Perrin G, Fischer G, Tabarin A, Rougon G, Figarella-Branger D (2003). Polysialylated neural cell adhesion molecules expressed in human pituitary tumors and related to extrasellar invasion. *J Neurosurg* **98**, 1084-1093.
- Troy FA 2nd (1979). The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers. *Annu Rev Microbiol* **33**, 519-560.
- Troy FA 2nd (1995). Sialobiology and the Polysialic Acid Glycotope. In: Rosenberg A (Ed.), *Biology of the Sialic Acids*. Plenum Press, New York.
- Vaithianathan T, Matthias K, Bahr B, Schachner M, Suppiramaniam V, Dityatev A, Steinhauser C (2004). Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid potentiates alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor currents. *J Biol Chem* **279**, 47975-47984.
- Velasco A, Hendricks L, Moremen KW, Tulsiani DR, Touster O, Farquhar MG (1993). Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of alpha-mannosidase I and II. *J Cell Biol* **122**, 39-51.
- Vimr ER, McCoy RD, Vollger HF, Wilkison NC, Troy FA (1984). Use of prokaryotic-derived probes to identify poly(sialic acid) in neonatal neuronal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1971-1975.
- Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**, 107-119.
- von der Ohe M, Wheeler SF, Wuhler M, Harvey DJ, Liedtke S, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, Geyer H, Dwek RA, Geyer R, Wing DR, Schachner M (2002). Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. *Glycobiology* **12**, 47-63.
- Wang W, Zhang S, Li Y, Xu L, Zhou J, Zhen Y (2000). Intracellular expression of a single-chain antibody directed against type IV collagenase inhibits the growth of lung cancer xenografts in nude mice. *Sci China C Life Sci* **43**, 433-441.
- Weinberg RA (2006). *The Biology of Cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, London.
- Weinhold B, Seidenfaden R, Röckle I, Mühlenhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H (2005). Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* **280**, 42971-42977.
- Wells JM, Melton DA (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* **127**, 1563-1572.
- Werge TM, Biocca S, Cattaneo A (1990). Intracellular immunization. Cloning and intracellular expression of a monoclonal antibody to the p21^{ras} protein. *FEBS Lett* **274**, 193-198.
- Wheeler YY, Kute TE, Willingham MC, Chen SY, Sane DC (2003). Intrabody-based strategies for inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2: effects on apoptosis, cell growth, and angiogenesis. *FASEB J* **17**, 1733-1735.
- Windfuhr M, Manegold A, Mühlenhoff M, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R (2000). Molecular defects that cause loss of polysialic acid in the complementation group 2A10. *J Biol Chem* **275**, 32861-32870.

- Wuhrer M, Geyer H, von der Ohe M, Gerardy-Schahn R, Schachner M, Geyer R (2003). Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM. *Biochimie* **85**, 207-218.
- Yabe U, Sato C, Matsuda T, Kitajima K (2003). Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J Biol Chem* **278**, 13875-13880.
- Yoshida Y, Kurosawa N, Kanematsu T, Kojima N, Tsuji S (1996). Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase gene (mST8Sia II) - brain-specific expression from a tata-less gc-rich sequence. *J Biol Chem* **271**, 30167-30173.
- Yuan Q, Strauch KL, Lobb RR, Hemler ME (1996). Intracellular single-chain antibody inhibits integrin VLA-4 maturation and function. *Biochem J* **318**, 591-596.
- Zhang C, Helmsing S, Zagrebelsky M, Schirrmann T, Marschall AL, Schüngel M, Korte M, Hust M, Dübel S (2012). Suppression of p75 neurotrophin receptor surface expression with intrabodies influences Bcl-xL mRNA expression and neurite outgrowth in PC12 cells. *PLoS One* **7**, e30684.
- Zhou P, Goldstein S, Devadas K, Tewari D, Notkins AL (1998). Cells transfected with a non-neutralizing antibody gene are resistant to HIV infection: targeting the endoplasmic reticulum and trans-Golgi network. *J Immunol* **160**, 1489-1496.
- Zuber C, Lackie PM, Catterall WA, Roth J (1992). Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem* **267**, 9965-9971.

Danksagung

Ich möchte mich zuerst und ganz besonders sowohl bei Herrn Dr. Thomas Böldicke als auch bei Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn bedanken. Ersterer hatte durch die langjährige Arbeit mit Intrabodies am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig die Grundidee zu diesem Projekt und kontaktierte daraufhin Frau Gerardy-Schahn vom Institut für Zelluläre Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover. Daraufhin erklärte sie sich bereit, die Finanzierung einer Doktorandenstelle zu übernehmen, was mir nach meiner Diplomarbeit die Gelegenheit gab, am HZI auf diesem Gebiet weiterzuarbeiten. Thomas hatte in der ganzen Zeit immer ein offenes Ohr und war neben der fachlichen Betreuung auch stets um das persönliche Wohl bemüht. Rita kann ich gar nicht genug für die unbürokratische und vertrauensvolle Kooperation sowie Aufrechterhaltung meiner Doktorandenstelle bedanken. Ihr unerschütterlicher Optimismus und ihre Herzlichkeit bei unseren Gesprächen war mir immer eine Inspiration. Diesbezüglich darf auch Frau Dr. Martina Mühlhoff nicht unerwähnt bleiben, deren Hilfsbereitschaft und bereitgestellte Materialien überhaupt erst den Grundstein für das Gelingen dieser Arbeit legten. In Bezug auf die verwalterischen Belange meiner Doktorandenstelle und die in Hannover erfolgte Betreuung sei auch Frau Christa Zeigner und Frau Dr. Beate Schwinzer herzlich gedankt.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig für die Übernahme der Mentoren- und damit Erstprüferschaft bedanken. Ebenso Herrn Prof. Dr. Michael Steinert vom Institut für Mikrobiologie, der sich bereit erklärte, den Prüfungsvorsitz für die Disputation einzunehmen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen lieben Kollegen vor Ort bedanken: Frau Karin Littmann-Janßen, die, obwohl Technische Assistentin einer anderen Arbeitsgruppe, oft mit Rat und Tat zur Seite stand. Frau Dr. Andrea Kröger und ihren Mitarbeitern für die Unterstützung bei den Mausversuchen. Meinen lieben Kolleginnen Ellen, Claudia und Franzi, die für viel Unterhaltung abseits der Arbeit gesorgt haben. Und natürlich allen Studenten, die während meiner Zeit am HZI teilweise von mir betreut wurden, sowie unserer erst später hinzugekommenen Technischen Assistentin Astrid, die alle zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beitrugen. Auf diese Weise lernte ich auch meine

Freundin, Elisa, kennen, die an dieser Stelle natürlich besonders erwähnt werden soll – für ihre Unterstützung und Geduld. Außerdem danke ich allen weiteren nicht namentlich erwähnten Personen, die einen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben.

Zuletzt, aber mit nicht geringerer Wichtigkeit, bedanke ich mich noch bei meiner Familie, deren Unterstützung nicht hoch genug eingeschätzt werden kann: Meine Mutter Monika, ihr Lebensgefährte Gerd, mein Bruder André und seine Frau Daniela.